

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ  
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ  
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

**Факультет біотехнології і біотехніки**

**Кафедра промислової біотехнології**

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

\_\_\_\_\_ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 р.

**Дипломний проєкт**

**на здобуття ступеня бакалавра**

**за освітньо-професійною програмою «Промислова біотехнологія»**

**спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»**

**на тему: «Технологія виробництва антибіотика тейкопланін. Дільниця  
біосинтезу»**

Виконала:

студентка IV курсу, групи БТ-62

Михальчук Валентина Володимирівна \_\_\_\_\_

Керівник:

Зав. каф. промислової біотехнології, д.т.н., доц.

Тодосійчук Тетяна Сергіївна \_\_\_\_\_

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для проведення  
технологічного процесу:

Ст. викл. каф. біотехніки та інженерії, к.т.н

Фесенко Сергій Вікторович \_\_\_\_\_

Рецензент:

Ст. викладач каф. екобіотехнології та біоенергетики, к.т.н.

Жукова Вероніка Сергіївна \_\_\_\_\_

Засвідчую, що у цьому дипломному  
проєкті немає запозичень з праць інших  
авторів без відповідних посилань.

Студентка \_\_\_\_\_

Київ – 2020 року

## ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

[illegible]

				ДП 6211 00.000.00		
	ПІБ	Підп.	Дата	Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Розробн.	Михальчук В.В				1	1
Керівн.	Тодосійчук Т.С				КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ПБТ Гр. БТ-62	
Консульт.						
Н/контр.						
Зав.каф.	Тодосійчук Т.С.					

**Національний технічний університет України**  
**«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»**

Факультет біотехнології і біотехніки  
Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

\_\_\_\_\_ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«\_27\_» лютого 2020 р.

**ЗАВДАННЯ**

**на дипломний проєкт студенту**

**Михальчук Валентині Володимирівні**

1. Тема проєкту «Технологія виробництва антибіотику тейкопланін. Дільниця біосинтезу», керівник проєкту Тодосійчук Тетяна Сергіївна, д.т.н, доц., затверджені наказом по університету від «21» травня 2020 р. № 1125-с

2. Термін подання студентом проєкту \_\_\_\_\_

3. Вихідні дані до проєкту: штам-продуцент *Actinoplanes teichomyceticus*; ферментер для промислового культивування - об'єм 6,3 м<sup>3</sup>; кінцевий продукт – порошок антибіотику тейкопланіна – субстанція для фармацевтичної промисловості, упаковка – поліетиленові пакети масою 1 кг.

4. Зміст пояснювальної записки: обрати і охарактеризувати продуцент для виробництва антибіотику тейкопланін; проаналізувати основні методи створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати

схему отримання продукту, що використовується у проєкті; навести основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва; скласти матеріальний баланс виробництва, розробити технологічну і апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції ферментеру, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду ферментеру – 1 арк. А1, технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1

#### 6. Консультанти розділів проєкту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Фесенко С.В., ст. викл. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання \_\_\_\_\_

#### Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	18.03.20-25.03.20	
2.	Біохімічні основи виробництва	26.03.20-15.04.20	
3.	Методи отримання промислових продуцентів	16.04.20-30.04.20	
4.	Технологічна частина	01.05.20-15.05.20	
5.	Складання апаратурної схеми	16.05.20-30.05.20	
6.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	16.05.20-30.05.20	
7.	Оформлення пояснювальної записки	31.05.20-05.06.20	

Студент

Валентина МИХАЛЬЧУК

Керівник

Тетяна ТОДОСІЙЧУК

**Пояснювальна записка  
до дипломного проєкту  
на тему: «Технологія виробництва антибіотика  
тейкопланін. Дільниця біосинтезу»**

Київ – 2020 року

## РЕФЕРАТ

Дипломний проект містить: 102 ст., 12 рис., 9 табл., 3 кресл., 95 посилань.

Робота присвячена виробництву глікопептидного антибіотику тейкопланіну як субстанції для фармацевтичної промисловості, що випускається у формі порошку.

В якості продуцента антибіотику тейкопланіна було обрано штам *Actinoplanes teichomyceticus* BNG 2315, отриманий в результаті індукованого мутагенезу з використанням ультрафіолетового випромінювання в якості фізичного мутагена.

На основі фізіолого-біохімічних характеристик продуцента було обрано ферментер із механічним перемішуючим пристроєм та барботером, які забезпечують надходження кисню до культури та ефективний масообмін в ході виробничого біосинтезу.

Для виділення та очистки продукту було запропоновано абсорбційний спосіб із використанням іонообмінної смоли Diaion HP-2MG, з подальшою ультрафільтрацією розчину для відділення домішок. Висушування продукту відбувається ліофільно з метою уникнення руйнування та втрати активності антибіотику.

Розроблено технологічну та апаратурну схему виробництва антибіотику тейкопланіна у відповідності до вимог до готової форми та якості продукту.

АКТИНОМІЦЕТИ, *ACTINOPLANES TEICHOMYCETICUS* BNG 2315, ТЕЙКОПЛАНІН, БІОСИНТЕЗ, АКТИВНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ІНГРІДІЄНТ, АДСОРБЦІЯ.

					ДП 6211. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РЕФЕРАТ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив		Михальчук В. В					5	102
Консульт.								
Керівник		Тодосієвичук Т. С						
Затвер.						КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ		

## ESSAY

The graduation project contains: 102 p., 12 fig., 9 tab., 3 drafts., 95 references.

The work is devoted to the production of the glycopeptide antibiotic teicoplanin as a substance for the pharmaceutical industry, produced in powder form.

As a producer of antibiotic teicoplanin was selected a strain of *Actinoplanes teichomyceticus* BNG 2315, obtained by induced mutagenesis using ultraviolet radiation as a physical mutagen.

Because of the physiological and biochemical characteristics of the producer, was selected a fermenter with a mechanical stirring device and a bubbler, which ensure the flow of oxygen to the culture and efficient mass transfer during production biosynthesis.

An absorption method using Diaion HP-2MG ion exchange resin was proposed to isolate and purify the product, followed by ultrafiltration of the impurity separation solution. Drying of the product is lyophilized in order to avoid destruction and loss of antibiotic activity.

The technological and hardware scheme of production of the antibiotic teicoplanin in accordance with the requirements to the finished form and quality of the product is developed.

ACTINOMYCETES, *ACTINOPLANES TEICHOMYCETICUS* BNG 2315, TEYCOPLANIN, BIOSYNTHESIS, ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENT, ADSORPTION.

					ДП 6211. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РЕФЕРАТ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив		Михальчук В. В					6	102
Консульт.								
Керівник		Тодосіючик Т. С					КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ	
Затвер.								

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	11
1.1 Основні промислові продуценти.....	11
1.2 Систематичне положення.....	13
1.3 Морфолого-цитологічні ознаки.....	13
1.4 Культуральні ознаки.....	15
1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки.....	17
1.6 Поширення у природі.....	20
2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА.....	22
2.1 Характеристика кінцевого продукту.....	22
2.2 Схема хімічних перетворень.....	24
2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології.....	29
2.4 Методи очистки цільового продукту.....	29
2.5 Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси.....	33
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ.....	36
3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту.....	36
3.2 Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту.....	39
3.2.1 Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів.....	40
3.2.2 Використання індукованого мутагенезу.....	42
3.2.3 Регуляція метаболізму у мікробній клітині.....	43

					ДП 6211. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ЗМІСТ	Стадія	Арк.	Аркушів
Розробив		Михальчук В. В					7	102
Перевір.								
Керівник		Тодосіючук Т. С						
Затвер.						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		



3.3 Схема отримання продуцента.....	46
РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	50
4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва.....	50
4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві.....	52
4.3 Опис технологічного процесу.....	55
4.4 Матеріальний баланс.....	67
4.5 Контроль виробництва.....	70
РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ.....	75
5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату.....	75
5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки.....	77
5.2.1 Визначення теплофізичних властивостей середовища.....	77
5.2.2 Конструктивний розрахунок.....	78
5.2.3 Розрахунок глибини воронки.....	80
5.2.4 Розрахунок барботеру.....	81
5.2.5 Розрахунок потужності, що витрачається на перемішування.....	82
5.2.6 Тепловий розрахунок.....	83
5.3. Вибір загальнозаводського обладнання.....	88
5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.....	89
ВИСНОВКИ.....	92
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....	93

## ВСТУП

Обсяг біотехнологічного сектору світового ринку останні роки щорічно зростає на 10–15%. Значна частина у структурі світового біотехнологічного сектору припадає на виробництво фармацевтичних препаратів. На сьогодні США являється лідером біотехнологічної фармацевтичної промисловості, де виробляється майже 50% світової продукції цієї галузі. У світі найбільшим сегментом ринку біотехнологічних препаратів являються антибіотики, що застосовуються в лікуванні захворювань людини, тварин, а також для кормових добавок і преміксів [1].

В даний час актуальною проблемою в цілому світі є набуття резистентності мікроорганізмів до відомих антибіотиків. Виникнення стійкості мікроорганізмів до антибіотиків і широке поширення стійких штамів мікроорганізмів значно знижують ефективність антибактеріальної терапії. Такою полірезистентністю характеризуються так звані метицилінрезистентні (або оксацилінрезистентні) стафілококи (MRS) *S. aureus*, в тому числі коагулазонегативні (CNS) *S. epidermidis*, пеніцилін-резистентні стрептококи *Streptococcus pneumoniae*, *S. viridans*, полірезистентні ентерококи *E. faecalis* і *E. faecium*. Введення в клінічну практику нових груп антибіотиків не вирішує проблему, а тільки послаблює її на короткий проміжок часу. Цей процес завжди супроводжується селекцією стійких мікроорганізмів вже до нових груп антибактеріальних препаратів, виникненню і виявленню нових механізмів резистентності до антибіотиків як відповідної реакції бактерій на негативний вплив середовища проживання. Це зумовило різке зростання інтересу і потреби в антибіотиках-глікопептидах, високоактивних щодо названих проблемних мікроорганізмів [2].

					ДП 6211. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ВСТУП	Стадія	Арк.	Акрушіб
Розробив		Михальчук В. В					9	102
Перевір.								
Керівник		Тодасіючук Т. С				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Затвер.								

Глікопептиди — клас антибіотиків, представлений глікозильованими циклічними чи поліциклічними не рибосомними пептидами. Механізм дії зазначених біоактивних речовин полягає у блокуванні синтезу пептидогліканів клітинної стінки чутливих мікроорганізмів. Окремими представниками цього класу препаратів є ванкоміцин, тейкопланін, блеоміцин [3].

Тейкопланін – глікопептидний антибіотик, який розроблений досить недавно. Його використовують як альтернативу ванкоміцину при лікуванні інфекцій, які викликані грампозитивними бактеріями. Перевагою тейкопланіну в порівнянні із ванкоміцином – він сильніше зв’язується з білками сироватки крові (більше 70%) та має досить тривалий період напіврозпаду в сироватці (понад 50 год). В Україні зареєстровані декілька препаратів, до складу яких входить тейкопланін як діюча речовина: Нортейк-здоров’я (Україна), Таргоцид (Італія), Тейко (Індія), Нортейк (Індія), Тейнін (Швейцарія, Італія), [1].

Метою роботи є розробити ефективну та економічно доцільну технологію виробництва антибіотику тейкопланіна, як субстанції для фармацевтичної промисловості.

Для досягнення цієї мети поставлено такі завдання:

- 1) обґрунтувати вибір промислового продуцента антибіотику *A.teichomyceticus* BNG 2315 та обрати на основі фізіолого-біохімічних особливостей продуценту склад поживного середовища для культивування;
- 2) описати основні фізико-хімічні властивості антибіотику та механізм його дії;
- 3) проаналізувати основні методи отримання продуцентів антибіотиків та обрати ефективний спосіб отримання промислового штама;
- 4) визначити біохімічні основи виробництва та обрати метод виділення і очистки цільового продукту;
- 5) розробити технологічну та апаратурну схеми виробництва, обрати відповідне апаратурне обладнання.

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						10
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

## РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

Антибіотики – це речовини, які вибірково пригнічують ріст бактерій, не пошкоджуючи еукаріотичні організми. Вибірковість дії цих речовин залежить від того, що вони впливають на процеси, істотні для бактеріальної клітини і несуттєві або відрізняються в еукаріотичної клітині [4].

### 1.1 Основні промислові продуценти

На сьогодні виявлено, що від 25 до 30 тис. природних сполук володіють антибіотичною активністю. Виділено понад 13 тис. антимікробних, протипухлинних і антивірусних сполук рослинного походження, а також близько 7 000 антибіотичних сполук, які утворюють різні тваринні організми, насамперед морські (губки, кишковопорожнинні, покривники, молюски тощо). Антибіотичну активність виявляють близько 1 700 природних сполук мікробного походження [1].

Велику частину відомих антибіотиків продукуються актиноміцетами – родами *Actinomyces* (*A. kanamycetus* – канаміцин, *A. iracie* – неоміцин, *A. ninesus* – окситетрациклін) та *Streptomyces* (*St. linconiensis* – лінкоміцин, *St. venezuelae* – левоміцетин). Іншим продуцентом є цвілеві гриби – різні види *Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. notatum*), *Cephalosporium* (*Acrenonium chrysogenum*), здійснюють біосинтез протипухлинних, антибактеріальних і антивірусних лікарських засобів. Важливими продуцентами являються еубактерії до яких належать представники роду *Bacillus*, роду *Pseudomonas* (продукують більшість антибіотиків поліпептидів), а також бактерії родів *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Proteus*. Невелика група антибіотиків продукується лишайниками, водоростями і іншими нижчими рослинами [5].

Необхідність пошуків антибіотиків обумовлена багатьма причинами.

					ДП 6211. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА		
Розрабид		Михальчук В. В					
Консульт.							
Керівник		Тодосійчук Т. С					
Затвер.							
					Стадія	Арк.	Акрюшіб
						11	102
					КПІ ім. І.горя Сікорського ФБТ		

Постійно ведуться пошуки ефективних антибіотиків для боротьби з тими захворюваннями, на збудників яких не діють існуючі препарати. Необхідність в антибіотиках обумовлена також тим, що при їх масовому використанні в лікувальних цілях у патогенних мікроорганізмів розвиваються механізми резистентності до них. При цьому необхідно постійно замінювати одні види антибіотиків на інші [6].

Ванкоміцин та тейкопланін являють собою перше покоління клінічно важливих глікопептидних антибіотиків. Ванкоміцин, що продукується актиноміцетом *Amicolatopsis orientalis*, вперше був введений в клінічне застосування у 1958 р., тоді як тейкопланін, що продукується *Actinoplanes teichomyceticus*, в 1978 році [7]. *A. teichomyceticus* є єдиним природним продуцентом фармацевтично цінного глікопептидного антибіотику тейкопланіну. Як і інші глікопептиди, тейкопланін впливає на синтез пептидоглікану клітинної стінки в грампозитивних бактеріях. Ряд характерних ознак, які включають ефективність, невисоку токсичність, унікальний характер глікозилування і карбоксилювання, особливості біосинтезу постійно зберігають цей препарат в центрі уваги [8].

До глікопептидних антибіотиків відноситься ванкоміцин, для якого характерні подібні властивості. Проте токсичність ванкоміцину лімітує і заважає його використанню для лікування хворих у тяжкому стані. В такому випадку застосовують відносно новий глікопептидний антибіотик тейкопланін, який має деякі переваги перед ванкоміцином. Зокрема його можна застосовувати для лікування дітей, включаючи і новонароджених.

Тейкопланін застосовується у медицині у боротьбі проти важких інфекцій, що викликають грам-позитивні мікроорганізми, *Staphylococcus spp.*, включаючи метицилін-стійкі штами, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Peptostreptococcus spp.*, *Corynebacterium jeikeium*, *Propionibacterium acnes*, *Clostridium spp.*, *C. difficile* [9].

## 1.2 Систематичне положення

За визначником Берджі А. *teichomyceticus* відноситься до групи 24 «Актиноплани» [10]:

надцарства : *Procaryota*

царства: *Бактерій (Bacteria)*

типа : *Actinobacteria*

класа: *Actinobacteridae*

порядка: *Micromonosporales*

родини: *Micromonosporaceae*

роду: *Actinoplanes*

виду: *Actinoplanes teichomyceticus*

## 1.3 Морфолого-цитологічні ознаки

Обраним продуцентом антибіотику тейкопланіну є *A. teichomyceticus* – одноклітинний мікроорганізм, утворює міцелій, гіфи міцелію довгі і галузисті, клітини видовжені.

*A. teichomyceticus* утворює субстратний міцелій (той що заглиблюється в субстрат) та повітряний міцелій. Субстратний міцелій забезпечує організм поживними речовинами, а повітряний міцелій утворює спори на спороносних гілках. Саме тут синтезуються вторинні метаболіти антибіотики. Міцелій септований, ділиться шляхом брунькування [11].

*A. teichomyceticus* утворює спори. Діаметр однієї спори становить близько 1 мкм. Вивільнені спори можуть бути одиничними або утворювати ланцюжки, що означає, що всередині спорангії спори організовані в ланцюжкові структури. Вивільнені спори активно рухаються і продовжують набухати; діаметр одиночної спори збільшується до 2-3 мкм. Через 5-6 годин активних рухів спори втрачають рухливість і починається процес проростання.

Спори проростають як в зануреній культурі, так на твердому середовищі. Після 12-16 годин зростання на твердому середовищі

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						13
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

розвивається субстратний міцелій. Спорангії від кулястої до неправильної форми з багатьма спорами. Спори та клітини мають джгутики. Спорангії утворюються на гіфах повітряного міцелію, які на відміну від гіфів субстратного міцелію мають оболонку над клітинною стінкою [12].

Етапи життєвого циклу *A. teichomyceticus* [8] :

- Проростання спор і формування вегетативного міцелію. Після інокуляції на поверхні твердого середовища ISP3 вони проростають (рис. 1.1, а) і утворюють субстратний міцелій (рис. 1.1, б). *A. teichomyceticus* формує субстратний міцелій протягом перших двох днів зростання в спорулюючих умовах.
- Проростання повітряних гіф. Через два дні зростання повітряні гіфи з'являються на поверхні вегетативного міцелію (рис. 1.1., в). Проростання повітряних гіф починається в певних точках.
- Формування спорангіальних зачатків. На верхівці деяких повітряних гіф утворюються спорангіальні зачатки (рис. 1.1, г). Повітряні гіфи перетворюються в спорангієносці.
- Розвиток спорангії. Примордії збільшуються в розмірах (з 1,5-2 до > 20 мкм, (рис. 1.1, д, е) і утворюють зрілі спорангії (> 20 мкм, рис. 1.1, є).
- Вивільнення спори. Після змочування зрілої спорангії рухливі спори вивільняються (рис. 1.1, ж, з). Вони можуть проростати і давати початок субстратному міцелію при інокуляції на твердому середовищі або проростати і утворювати фрагментовані гіфи в умовах зануреного зростання.

ДНК *A. teichomyceticus* характеризується високим вмістом Г+Ц нуклеотидів. В нуклеоїді міститься одна лінійна хромосома розміром 8 – 9 млн. п. н., з довгими інвертованими повторами нуклеотидних послідовностей і білками, які ковалентно зв'язані з 5'-кінцем хромосомної ДНК. За розміром, та за кількістю генів актиноміцети належать до прокаріотичних організмів із найбільшим геномом [13].

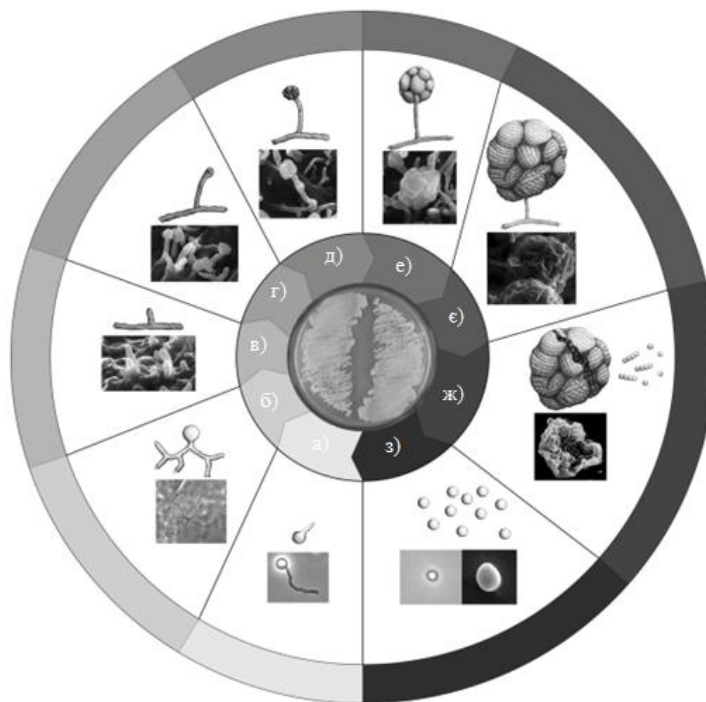


Рисунок 1.1 Етапи життєвого циклу *A. teichomyceticus*: на поверхні вегетативного міцелію виникають спорангіофорні гіфи (а) з подальшим поступовим розвитком у спорангії (б-є) та вивільненням спор (ж,з) [8].

Клітинна стінка *A. teichomyceticus* містить гліцин та 2,6-діазопімелінову кислоту. У гідролізатах клітин присутні D-ксилоза і L-арабіноза. У складі фосфоліпідів присутній фосфатидилетаноламін, тоді як фосфатидилметилетаноламін, фосфатидилхолін, глюкозамінвмісні фосфоліпіди і фосфатидилгліцерол відсутні [10]. Міколінові кислоти відсутні; МК-9 (Н4) і МК-10 (Н4) є основними менахінонами. Основні метилові ефіри жирних кислот: (> 10%): ізо-С16: 0 (20-7%), ізо-С15: 0 (15-1%), антеізо-С15: 0 (8-8%), антеізо- С17: 0 (19-8%); інші зустрічаються в менших кількостях [11].

#### 1.4 Культуральні ознаки

Експериментально доведено, що вміст тейкопланіну в середовищі впливає на ріст культури. Якщо концентрація тейкопланіну збільшується повільно, в бактерії є час, щоб адаптуватися до нового середовища, активуються гени, що кодують стійкість до тейкопланіну. Якщо замість цього концентрація тейкопланіну збільшується швидко бактерії вмирають [14].



*A. teichomyceticus* добре спорує на соєво-манітному агарі (СМ), а також може рости на вівсяному агарі (ОМ, ISP3). При вирощуванні на СМ або ОМ спостерігається утворення повітряних гіф протягом перших двох днів зростання газону. Проростання повітряних гіф починається тільки після другого дня інкубації.

*A. teichomyceticus* на твердому поживному середовищі (ПС) ISP3 здатен утворювати округлі колонії з характерним оранжевим кольором (рис. 1.2) та різним характером поверхні (табл. 1.1).



Рисунок 1.2 Колонії *A. teichomyceticus* на поживному середовищі ISP3 [15].

*A. teichomyceticus* володіє генетичною здатністю синтезувати SapB-подібну поверхнево-активну молекулу, яка допомагає вивільненню спор. Проростання повітряних гіф супроводжується появою і дозріванням спорангіїв. Дозрівання спорангіїв відбувається протягом 4-7 днів зростання, але цей процес відбувається по-різному на чашках ОМ і СМ. Якщо культура вирощується на СМ агарі, процес дозрівання йде поступово: утворення повітряних гіф, спорангіальних зачатків і зрілої спорангії синхронізується. У ОМ зрілі спорангії з'являються значно раніше і протягом всього періоду зростання по-різному розвиваються спорангії на газоні. Розвиток спорангії супроводжується процесом вивільнення спор [8].

Таблиця 1.1 Характеристика культуральних властивостей  
*A. teichomyceticus* на поживному середовищі ISP3 [15].

Характеристика колонії	Зовнішній вигляд
Характер контуру краю колонії	Хвилястий
Профіль	Випуклий
Поверхня	Зморшкувата
Колір	Оранжевий
Структура	Однорідна
Консистенція	Щільна
Форма колонії	Округла

### 1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки

Середовища для культивування актиноміцетів підбираються індивідуально для кожного продуцента. Вони повинні містити в собі джерела вуглецю, азоту, а також різні мікро- і макроеlementи.

При підборі джерел вуглецю необхідно враховувати, які вуглеводи здатний засвоювати даний мікроорганізм. Найважливішими джерелами вуглецю для культивування актиноміцетів є різні цукри, багатоатомні спирти, рідше вуглеводні. Так само для культивування актиноміцетів використовують такі джерела вуглецю, як: глюкоза, сахароза, галактоза, мальтоза, крохмаль, маніт, етанол; рідше кислоти: бурштинову, піровиноградну, оцтову, молочну.

Джерела азоту дуже впливають на продукування актиноміцетом антибіотичних речовин. Джерела азоту діляться на органічні і неорганічні. До органічних джерел азоту відносяться кукурудзяний і дріжджовий екстракти, різні пептони (м'ясний, соєвий, пшеничний), соєве борошно та ін. До неорганічних джерел відносять різні амонійні солі, солі азотної (рідше азотистої) кислоти, амінокислоти.

Джерелами мінерального живлення мікроорганізмів служать фосфор, сірка та інші мікро- і макроелементи. Фосфор входить до складу нуклеїнових кислот, коферментів і фосфоліпідів. Актиноміцети дуже чутливі до сполук фосфору в середовищі і діляться на: високочутливі, середньочутливі і малочутливі. При надлишку мінерального джерела фосфору в середовищі відбувається зміна в біохімічному складі цитоплазми міцелію актиноміцетів, порушуються фізіологічні функції клітини; іноді це різко позначається на процесі утворення антибіотиків. У ПС джерелом фосфору найчастіше є фосфати (солі фосфорної кислоти) [16].

На сьогодні відомо п'ять основних ПС, що використовувалися для продукції тейкопланіну. Рівень продукції тейкопланіну штамом дикого типу на цих середовищах коливався в діапазоні 0-25 мг/л. Знайдено найоптимальніші джерела карбону – глюкоза у комбінації із солодовим екстрактом та нітрогену – соєвий шрот (сприяє виробництву біомаси) із додаванням дріжджового екстракту (сприяє виробництву Т-А2) в середовищі, яке можна використовувати для продукції тейкопланіну в промислових умовах. Додавання певних концентрацій карбонату кальцію також мало позитивний вплив на рівень біосинтезу тейкопланіну.

Високі концентрації аміаку або фосфату знижують як питому швидкість росту в першій фазі експоненціального росту, так і загальний вихід тейкопланіну. Крім того, високі початкові концентрації амонію приводять до порушення росту і зниження продуктивності антибіотика [17].

*A. teichomyceticus* росте добре на середовищах ISP2 та Бенета, утворюючи великі колонії на третій день культивування. Колонії формуються за нокардіальним типом, вони слабо врастають в агар. Диференціація субстратного міцелію із формування спорангіїв на таких середовищах не відбувається: на 6 день росту культури утворюються тільки окремі гіфи повітряного міцелію. Гіфи вегетативного міцелію на цих середовищах мають яскраво-помаранчеве забарвлення (рис. 1.3. а, к).

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						18
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

На середовищах ISP3 та CM *A. teichomyceticus* активно спорулює, формуючи спорулюючий газон на 6-7 день росту культури (рис. 1.3, б, з). Колонії врастають в агар. Вегетативні гіфи на середовищі ISP3 мають помаранчево-кремове забарвлення, на середовищі CM – кремове. На середовищі CM *A. teichomyceticus* синтезує меланоїдний пігмент (рис. 1.3, з).

На середовищах ISP4, ISP5, ISP6, ISP7, L-агарі та хітиновому середовищі *A. teichomyceticus* формує незабарвлений вегетативний міцелій, колонії врастають в агар, але формування спорангіїв не спостерігається; морфологічний розвиток на цих середовищах зупиняється на етапі формування спорангіофорів (рис. 1.3, г, д, е, є). Синтез меланоїдного пігменту також спостерігається на середовищі ISP6. На середовищі Чапека *A. teichomyceticus* формує вегетативний міцелій кремового кольору із надзвичайно добре розвиненим повітряним міцелієм (рис. 1.3, ж), проте без формування спорангіїв [18].

На сьогодні середовище TM1 (30 г/л солодового екстракту, 10 г/л глюкози, 15 г/л соєвого шроту, 5 г/л дріжджового екстракту і 4 г/л CaCO<sub>3</sub>) є найоптимальнішим для продукції тейкопланіну [18]. На цьому середовищі рівень продукції тейкопланіну досягає 100 мг/л при культивуванні в колбах та більше 200 мг/л при культивуванні в ферментерах малого об'єму. Внесення в TM1 різних жирних кислот у формі метилових естерів чи олій дає можливість модулювати співвідношення різних компонентів T-A2 комплексу. Внесення до середовища L-валіну збільшує рівень синтезу тейкопланіну до 140%. Через 60 годин від початку культивування продуцента на середовищі TM 1 починається біосинтез тейкопланіна та досягає піку на 120-140 год. Після 160 год культивування продукція тейкопланіну падає і настає частковий лізис культури [18].

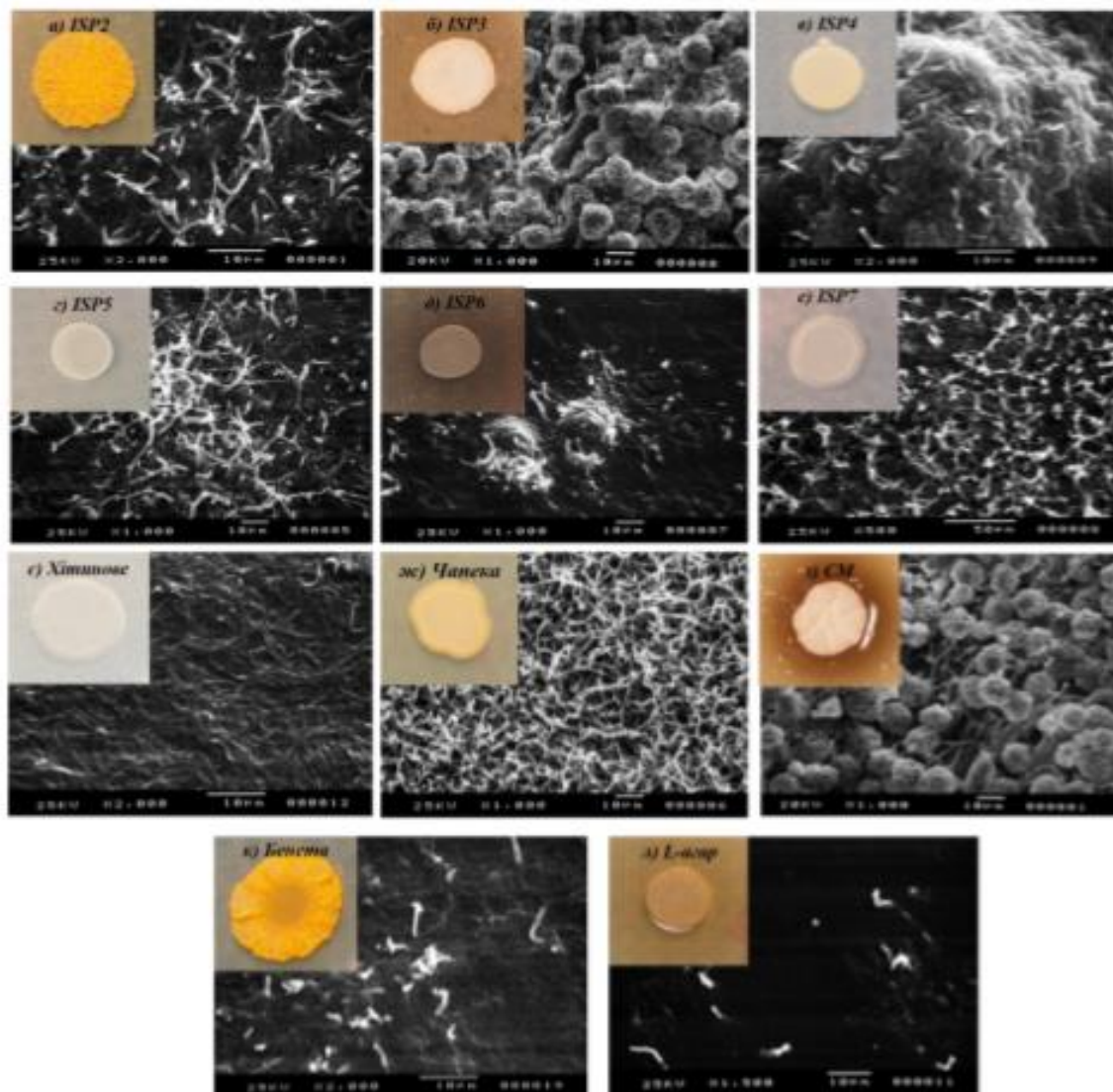


Рисунок 1.3 Морфологія колоній та мікроморфологія поверхонь газонів *A. teichomyceticus* на 6 добу вирощування на агаризованих середовищах [18]

## 1.6 Поширення у природі

Актиноміцети – це група мікроорганізмів, яка займає проміжне положення між бактеріями і грибами. Клас *Actinomycetes* поділяється на порядки: *Actinomycetales* (актиноміцети, які не утворюють рухомих клітин), *Actinoplanales* (актиноміцети з рухомими клітинами), *Mycobacteriales* (мікобактерії) і *Coccales* (коки) [19].

Серед актиноміцетів є аероби і анаероби, мезофіли і термофіли. Актиноміцети переважно сапрофіти, але серед них є і паразити, що шкодять людям, тваринам і рослинам. В останні роки вони набули великого

практичного значення в зв'язку з їх здатністю продукувати різні біологічно активні речовини, які використовуються людиною. З багатьох культур актиноміцетів отримують лікарські препарати – антибіотики, які використовуються в медицині, ветеринарії, рослинництві, харчовій промисловості.

Актиноміцети можуть розвиватися на скелях, де є невелика кількість поживних речовин, в ґрунтах, розкладаючи при цьому гумусові речовини, важкодоступні для інших мікроорганізмів. Актиноміцети успішно конкурують з іншими мікроорганізмами ґрунту, здатні легко змінюватися під впливом навколишніх умов і пристосовуватися до середовища. Завдяки таким властивостям вони широко поширені в природі, можуть легко вирощуватися в лабораторних умовах [20].

Представники родини *Micromonosporaceae* були виділені з різних місць проживання, включаючи ґрунт, відкладення в прісній і морській воді, ризосферу і тканини рослин. Багато видів розкладають хітин, целюлозу, лігнін і пектин, і ці мікроорганізми відіграють важливу роль в обороті органічного рослинного матеріалу. Крім того, багато штамів продукують корисні вторинні метаболіти і ферменти [21].

Представники роду *Actinoplanes*, так як і представники роду *Streptomyces*, розвиваються виключно у формі міцелію. Розмножуються і розповсюджуються за допомогою спор. Міцеліальний ріст забезпечує пристосування цих сапрофітних організмів до основного середовища їх проживання ґрунту. У таких умовах живлення здійснюється шляхом розкладання органічних решток за допомогою гідролітичних ферментів, які виділяє міцелій [13].

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						21
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

## РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

### 2.1 Характеристика кінцевого продукту

Тейкопланін — це новий антибіотик, хімічно пов'язаний з групою глікопептидів, яка також включає ванкоміцин і ристоцетин. Він був виділений з *A. teichomyceticus* і володіє бактерицидною активністю відносно грампозитивних патогенних бактерій [22].

Антибактеріальні глікопептиди зупиняють біосинтез клітинної стінки бактерій, зв'язуючись з D-ала-D-аланіновим кінцем ПГ який синтезується, блокуючи його позаклітинну полімеризацію і згодом пригнічуючи ріст і поділ клітин. Переваги тейкопланіну включають більш сприятливу фармакокінетику (більш тривалий період напіввиведення) і зниження частоти нефротоксичності в порівнянні з ванкоміцином.

Структура тейкопланіну, являє собою лінійний гептапептид, що складається з трьох гідроксифенілгліцинів (ГФГ), двох дигідроксифенілгліцинів (ДГФГ) і двох тирозинів (Тир), з такою послідовністю, що починається з амінокінця: ГФГ-Тир-ДГФГ-ГФГ-ГФГ-Тир-ДГФГ (рис. 2.1) [23].

Глікопептидні антибіотики типу I-IV, складаються з гептапептидного каркасу, що містить ароматичні амінокислоти. Вони підрозділяються на п'ять типів, з яких чотири (типи I-IV) виявляють антибактеріальні властивості. Структури типу I, таких як ванкоміцин, містять п'ять ароматичних амінокислот і дві аліфатичні (Лей1 і Асп3), тоді як в типах II, III і IV всі сім амінокислот є ароматичними.

Сполуки типу IV, такі як тейкопланін, мають додатковий довгий жирнокислотний ланцюг, приєднаний до цукру, приєданого до центрального 4-ГФГ. У випадку антибактеріальних глікопептидів гептапептидне ядро

					ДП 6211. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Михальчук В. В			РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА		
Консульт.							
Керівник		Тодасійчук Т. С					
Затвер.							
						Стадія	Арк.
							22
						Аркуші	102
						КПІ ім. І.Горького	
						ФБТ	

забезпечує зв'язування антибіотиків із дипептидним кінцем D-аланін-D-аланін попередників ПГ, блокуючи реакції транспептидації і трансглікозилювання на пізніх позаклітинних стадіях перехресного зв'язування ПГ [24].

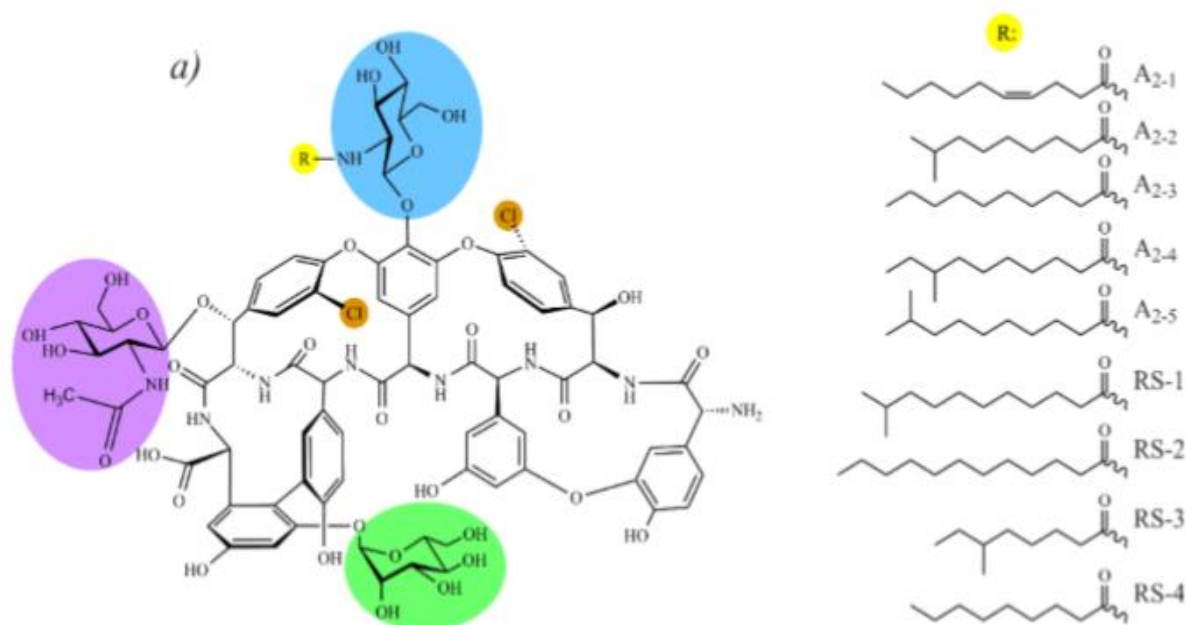


Рисунок 2.1 Хімічна структура тейкопланіну. Бузковим, блакитним та зеленим кольорами позначено залишки N-ацетил-глюкозаміну, N-ацилглюкозаміну та D-манози. Помаранчевим показано атоми хлору, а жовтим – місце приєднання бічних аліфатичних ланцюгів [24].

Первинні і вторинні модифікації глікопептидних антибіотиків підвищують розчинність, надають стабільність, впливають на димеризацію, визначають прикріплення до мембрани, обмежують конформаційну гнучкість для уникнення деградації. Хлорування є найбільш поширеною модифікацією глікопептидів, починаючи від одного до чотирьох атомів хлору, що додаються в різні глікопептиди. Хлорування пов'язано з внутрішньомолекулярною димеризацією і наданням ліпофільної природи, яка може сприяти спорідненості до мембранного компартменту.

Залишки цукрів глікопептидів грають важливу роль в доставці антибіотиків до їх мішені, модулюючи розчинність і визначаючи



варіабельність активності антибіотиків. Ацилювання тейкопланіну надає антибіотику ліпофільну природу. Клінічно використовуваний тейкопланін є сумішшю п'яти молекул, які незначно розрізняються по довжині (C10-C11) і розгалуженням хвостів жирних кислот, основним компонентом яких є та, яка містить 8-метілнonanову (iso-C10: 0) кислоту і названа Т-А2 [22].

Ароматичні залишки утворюють специфічні окислювальні зв'язки, які утворюють два сусідні цикли на «вершині» молекули і два окремі цикли на «дні». Два верхніх цикли утворені двома дифеніловими ефірними зв'язками між залишками амінокислоти 2 і 4 і між 6 і 4. Два нижніх цикли утворені дифеніловим ефірним зв'язком між амінокислотою 1 і 3 і С-С-зв'язком між 5 і 7. Атоми хлору знаходяться на кожному із залишків Тир (амінокислоти 2 і 6). Три цукрових залишки приєднані до арильних груп: маноза (по амінокислоті 7), ацетилглюкозамін (по амінокислоті 6) і ацилглюкозамін (по амінокислоті 4) [23].

## 2.2 Схема хімічних перетворень

Тейкопланін в промисловості отримують шляхом виробничого культивування продуцента *A. teichomyceticus*. Максимальний рівень продукції тейкопланіну культурою *A. teichomyceticus* відбувається в пізній експоненціально-стаціонарній фазі росту, коли швидкість проліферації клітин знижується. Механізми опосередкованої резистентності залучені в фазу активного росту та поділу клітин. Коли штам входить в стаціонарну фазу, стійкість більше не потрібна, оскільки поділ клітин і синтез клітинної стінки припиняється, клітини стають толерантними до високих концентрацій свого власного продукту [25].

Біосинтез глікопептиду можна розділити на три етапи [26]:

- забезпечення основних будівельних блоків специфічними шляхами біосинтезу;

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						24
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- зв'язування будівельних блоків, з'єднання ароматичних бічних ланцюгів і галогенування, здійснюються одним мультиферментним комплексом;

-модифікація гептапептиду глікозилтрансферазою і метилтрансферазою.

При біосинтезі глікопептидів надходження Тир може регулювати швидкість, оскільки попередники непротеїнових амінокислот  $\beta$ -гідрокситирозин і 4-ГФГ є Тир або гідроксифенілпіруват (ГФП) відповідно. Крім того, Тир є донором аміногруп в біосинтезі ДГФГ, що вказує на ключову роль шикиматного шляху в постачанні попередниками. Ароматична амінокислота L-Тир утворюється з хоризмата, кінцевого продукту шляху шикимат.

Перший ключовий фермент шляху шикимат, 3-дезоксид-арабін-гептулозонат-7-фосфат синтаза, конденсує пентозофосфатний шлях, проміжний D-еритрозо-4-фосфат і гліколітичний шлях, проміжний фосфоенолпіруват, до 3-дезоксид-арабіно-гептулозонат-7-фосфат. Другий ключовий фермент – префенатдегідрогеназа, яка перетворює префенат в 4-ГФП, направляючи потік в сторону Тир. Біосинтез ароматичних амінокислот у більшості бактерій строго регулюється за допомогою механізмів контролю зі зворотним зв'язком. Щоб забезпечити надходження достатньої кількості Тир або його попередників, біосинтез антибіотиків може потребувати специфічних метаболічних адаптацій, наприклад, експресії ізоферментів, які необхідні для запобігання регуляції зворотного зв'язку [26].

Синтез ДГФГ (рис. 2.2) потребує 5 ферментів, DpgA-D (дегідрофенілацетат-синтаза, еноїлКоА-гідратаза, гідроксиацилдегідрогеназа та еноїл-КоА-ізомераза) та HpgT (4-гідроксифенілгліцин-трансферази). DpgA – полікетидна синтаза типу III ініціює синтез шляхом конденсації ацетил-КоА з трьома молекулами малоніл-КоА з утворенням 3,5-дигідроксифенілацетил-КоА і три вільних похідних CoASH. Потім тетра-карбонільне з'єднання циклізується з утворенням проміжного C8. DpgB / D потім зневоднює та

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						25
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ізомеризує проміжний продукт для ароматизації кільця. DpgC окислює ароматичний проміжний продукт у бензиловому вуглеці, використовуючи кисень до альфа-кето-з'єднання-3,5-дигідроксифеніл гліюксилат. DpgC здійснює це окислення за відсутності кофакторів заліза, гему, флавіну чи птерину. Далі молекула трансамінується 4-гідроксифенілгліциновою трансферазою, до ДГФГ.

Пропонований шлях біосинтезу ГФГ (рис. 2.2) включає чотири ферменти. Шлях починається з перетворення префенату в р-ГФП префенат дегідрогеназою (Pdh). 4-гідроксиманделатсинтаза (HmaS), гідроксиманделатоксидаза (Hmo) і р-гідроксифенілгліцинтрансаміназа (HpgT/Pgat), відповідно, каталізують перетворення з р-ГФП в L- р-гідроксиманделат в р-гідроксиматілбензоілформат в ГФГ [18].

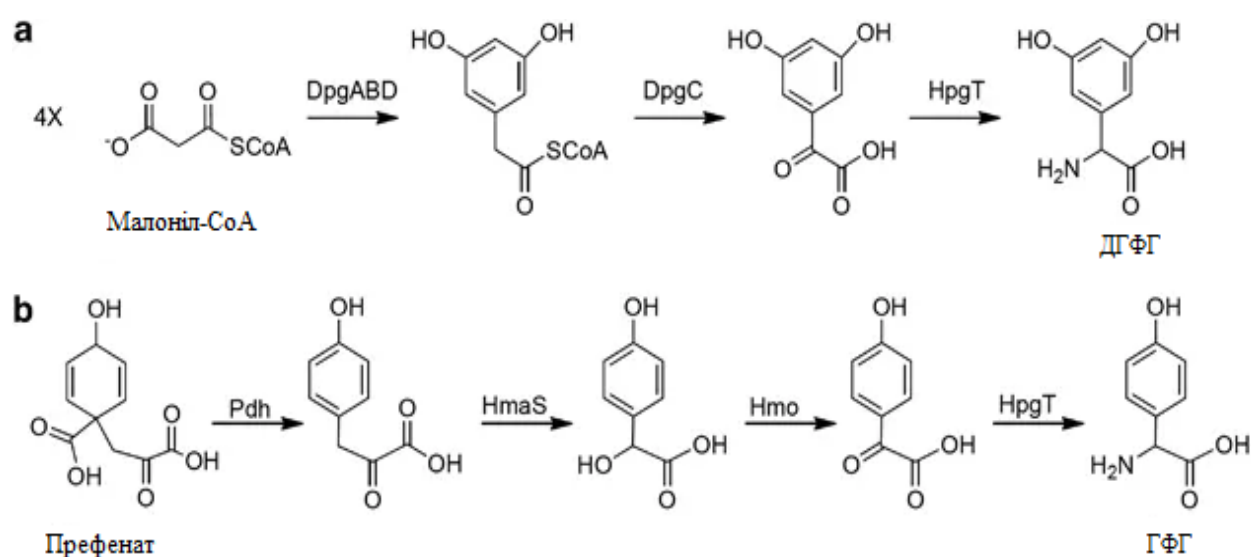


Рисунок 2.2 Схеми синтеза 3,5-дигідроксифенілгліцин (а), та 4-гідроксифенілгліцин (b) [18].

Фактори T-A2-2, T-A2-4 і T-A2-5 характеризуються розгалуженими жирними кислотами: 8-метилнонанова (ізо-С10:0), 8-метилдеканова (антеізо-С11:0) і 9-метилдеканова (ізо-С11:0) кислотами відповідно. Їх попередники як жирних кислот клітинної мембрани були ідентифіковані 14-метилпентадеканова (ізо-С16:0), 14-метилпентадеканова (антеізо-С17:0) і 13-метилтетрадеканова (ізо-15:0) кислоти, біосинтез яких посилюється

додаванням амінокислот L-валіну, L-ізолейцину і L-лейцину. Ізобутират, ізовалерат і 2-метилбутират представляють собою вихідні молекули для синтезу парних вуглецевих ізокислот, непарних вуглецевих ізокислот і непарних вуглецевих антеізокислот [22].

Другий етап – збірка компонентів амінокислот глікопептидних антибіотиків в гептапептидний відбувається за механізмом синтезу нерибосомних пептидів, що включає мультиензимну тіо-матрицю. Відповідно до цього механізму кожна амінокислота розпізнається і активується відповідним модулем нерибосомальної пептид-синтетази (НРПС). Глікопептид НРПС складається з семи модулів і складається з чотирьох ферментів в молекулі тейкопланіну – TeiA, TeiB, TeiC и TeiD. Кожен модуль відповідає за активацію і тіолірування однієї амінокислоти.

Домени конденсації, домени епімеризації і один тіоестеразний домен завершують типову доменну організацію НРПС. Останні кроки, що ведуть до аглікону з лінійного гептапептиду, вимагають оксигенази, чий послідовності схожі з монооксигеназою P450. До них відносяться гідроксилування амінокислот в положеннях 2 і 6, замикання кільця з утворенням двох диариллових ефірів; одне додаткове замикання кільця відбувається між амінокислотами 1 і 3. Хлорування і циклізація бічного ланцюга відбуваються в комплексі НРПС. N-метилування є пізньою стадією біосинтезу глікопептидів [22].

Тейкопланін містить два хлорованих положення Тир: 2 (3-Cl-Тир) і 6 (3-Cl-β-Гтир). Галогеназа Orf8 каталізує галогенування обох амінокислот. Вважається, що хлорування відбувається на дуже ранній стадії біосинтезу до фенольного окисного поєднання [27].

Як тільки гептапептидний остов сформований, починається циклізація лінійної структури (рис. 2.3) [12]. Оксидаза цитохрому P450 є ферментом, який виконує реакції поєднання. ОхуВ утворює перше кільце шляхом поєднання залишків 4 і 6. Потім ОхуА пов'язує залишки 2 і 4 з подальшим утворенням

зв'язку С-С між залишками 5 і 7 за допомогою ОхуС. Четвертий фермент ОхуD каталізує зв'язування залишків 1 і 3 [27]

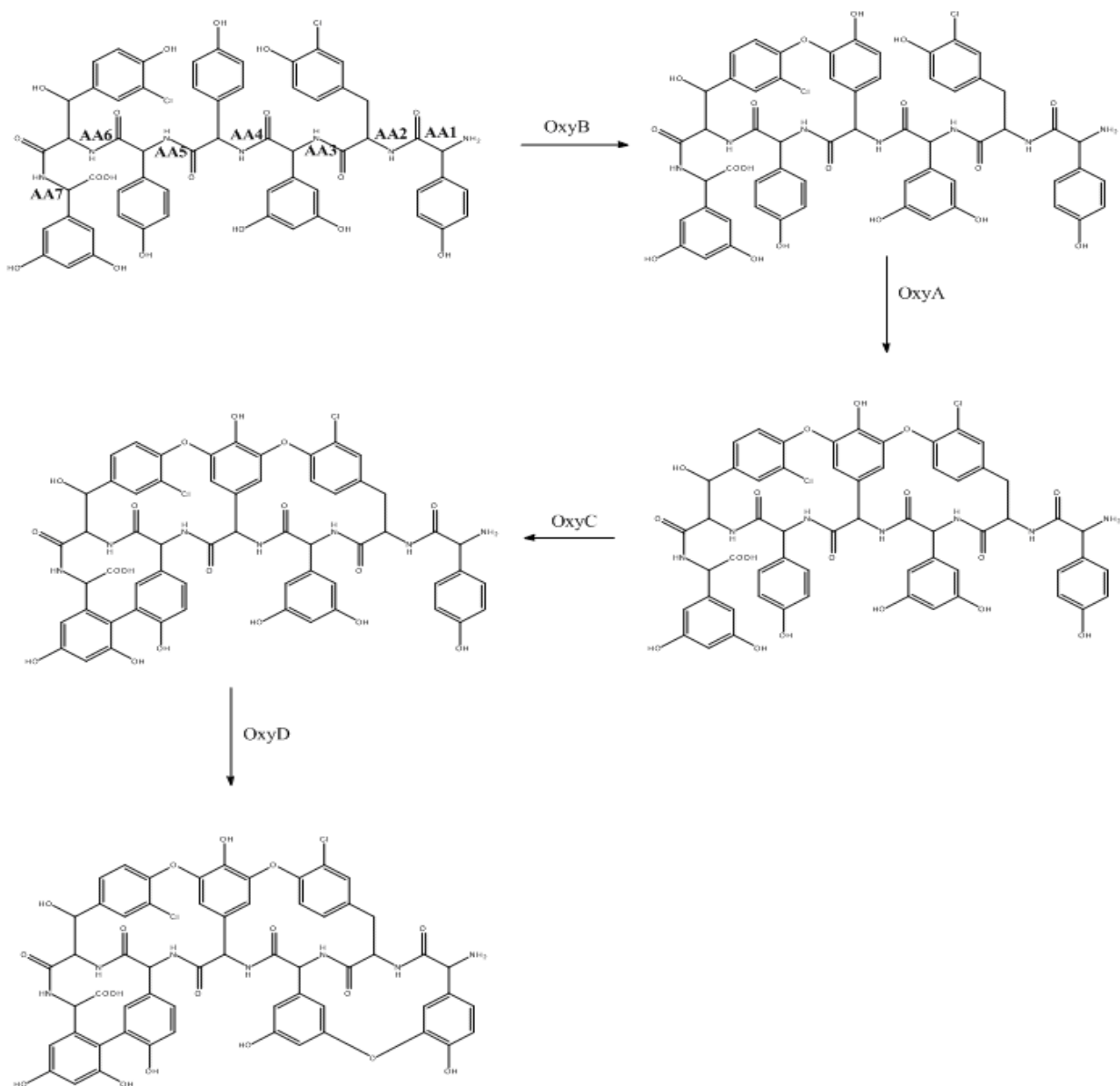


Рисунок 2.3 Схема циклізації аглікону тейкопланіна [27]

Специфічне глікозилювання відбувається після утворення гептептидного аглікона. Для глікозилювання аглікона тейкопланіну необхідні три окремі глікозилтрансферази. Дві з цих глікозилтрансфераз беруть участь в додаванні одиниць N-жирного ацил- $\beta$ -D-глюкозаміну і N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаміну. Третя манозилтрансфераза відповідає за додавання одиниці D-манози до залишку 7. Жирний ацильний ланцюг пов'язаний амідним зв'язком з глюकोзаміною частиною під дією ацилтрансферази [28, 29].

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП 6211. 00.000 ПЗ

Арк.

28

## 2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології

Кінцевим продуктом виробництва являється антибіотик тейкопланін як активний фармацевтичний інгредієнт та є субстанцією для фармацевтичної промисловості. За зовнішнім виглядом – це жовтий, аморфний порошок добре розчинний у воді. Найбільш значущим для клінічного застосування є тейкопланін А2. За різних умов культивування *A. teichomyceticus* його вміст становлять від 89 до 95% усього тейкопланінового комплексу [22].

У складі фільтрату окрім антибіотика присутні супутні домішки які можна розділити на наступні групи [30] :

- Одна група представляє домішки з високою молекулярною масою, які можуть бути видалені методами розділення, придатними для великих молекул, такими як адсорбція на смолах або гель-фільтрація. В основному вони містять макромолекулярні залишки клітинної структури.
- Друга група являє низькомолекулярні домішки, ймовірно. Так, з більш низькою полярністю, які також походять із неспецифічних клітинних компонентів, що включають молекули пов'язані подвійними зв'язками з ліпідними частинами.
- Третя група представляє продукти розкладу, які утворюються в результаті окислювального амінолізу.

## 2.4 Методи очистки цільового продукту

Процес виділення і очищення антибіотиків являє собою складний технологічний процес. Мала стабільність багатьох антибіотиків і можливість втрати їх активності при хімічних перетвореннях привели до переважного використання для виділення і очищення антибіотиків фізико-хімічних прийомів поділу речовин, включаючи сорбцію, екстракцію та кристалізацію,

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						29
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

тобто таких процесів, які не супроводжувалися різким хімічним впливом на молекулу антибіотика.

Попередня обробка культуральної рідини і видалення міцеліальної маси є першою стадією перед виділенням і очищенням. Власне, вже на цій стадії починається часткове очищення культуральної рідини від домішок. Основним завданням попередньої обробки культуральної рідини є отримання нативного розчину з найбільшим ступенем чистоти, з найменшими втратами, що дозволяють забезпечити успішне проведення подальших операцій виділення і хімічного очищення антибіотика. Більшість антибіотиків виділяються і очищаються з нативного розчину трьома методами: 1) екстракційним, 2) іонообмінним, 3) осадженням нерозчинного з'єднання [31].

У біосинтетичному процесі одночасно з антибіотиком утворюються різні домішки, такі як компоненти середовища та продукти метаболізму. Відповідно, необхідний ряд процесів виділення та очищення антибіотиків, які є критичними факторами економічного отримання високо чистого антибіотика [32].

Оскільки синтез тейкопланіну екзогенний – виділення та очищення антибіотика проводиться з культуральної рідини. Традиційні технології очищення тейкопланіну з культуральної рідини мають ряд проблем пов'язаних з отриманням високо очищеного тейкопланіну: важко підтримувати стабільність в тейкопланіні, органічні розчинники, які використовуються в процесі очищення токсичні для людини, вихід продукту є відносно низьким, виробничі витрати високі.

Відомий метод очистки тейкопланіна із культуральної рідини з попереднім відділенням міцелія продуцента фільтруванням. Міцеліальний осад екстрагують ацетоном, утворений екстракт знову екстрагують бутанолом в кислому рН. Фільтрат також екстрагують бутанолом в кислому рН. Утворені екстракти концентрують вакуумною перегонкою з утворенням осадів. Осади змішують, суміш очищають на колонці з смолою Sephadex LH 20. Проте даний метод має ряд недоліків, які пов'язані із забрудненням навколишнього

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						30
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

середовища, економічною недоцільністю та невисоким вмістом антибіотика в кінцевому продукті [33].

Описаний ще один спосіб очистки тейкопланіна, який включає стадію фільтрування культуральної рідини з подальшим застосуванням хроматографії із використанням нейтральної адсорбційної смоли HP-20, елюювання розчином метанолу та стадії афінної хроматографії з іммобілізованим лектином. Даний метод недоцільно застосовувати, оскільки великі втрати на стадії адсорбції та низька чистота тейкопланіну, необхідно видаляти метанол перед застосуванням лектин-іммобілізованої смоли, висока вартість смоли та лектину [34].

Інший метод очистки тейкопланіну включає стадію відділення міцеліальної маси фільтруванням, з подальшою адсорбцією тейкопланіну із фільтрату на адсорбційній смолі. Адсорбційну смолу промивають розведеною соляною кислотою, а тейкопланін елюють розчином ацетону. Елюат концентрують вакуумною перегонкою та обробляють активованим вугіллям. Таким чином антибіотик очищають. Цей метод також має недоліки: стабільність і активність тейкопланіна знижується через зміну рН, вихід тейкопланіну низький, термін використання адсорбційної смоли недоготривалий [35].

Враховуючи недоліки вище наведених технологій очистки, обраний спосіб очистки тейкопланіну включає наступні етапи [36] :

- Відділення біомаси продуценту фільтруванням
- Виділення продукту сорбційним методом
  - Пропускання фільтрату через адсорбційну смолу
  - Елюювання тейкопланіну розчинником
- Відділення домішок (ультрафільтрація макромолекул)
- Концентрування розчину антибіотика (вакуум випарювання розчину)
- Сушка продукту



pH фільтрату як вихідного матеріалу на етапі очищення з використанням пористої адсорбційної смоли має бути від 6,5 до 7,5, в процесі очистки не потрібно підтримувати pH.

Адсорбційна смола - синтетичний адсорбент з діаметром пор від 20 до 300 Å, який складається з полімеру, (1) полімер стиролу та дивінілбензолу, (2) зшитий ароматичний або аліфатичний полімер, (3) метакриловий адсорбент. Елююючий агент, який використовується для елюювання тейкопланіну, адсорбованого на пористу адсорбційну смолу, може включати (1) нейтральну сіль, наприклад, 0,05 М, 0,5 М, (2) розчин одного або більше спиртів C1 до C4 або один або більше кетонів C3 до C6 та / або (3) води.

Нейтральною сіллю може бути, натрієва сіль, така як хлорид натрію і фосфат натрію, і калієва сіль, така як хлорид калію. В якості елюючого агенту був обраний 40% розчин метилового спирту.

Рідина містить тейкопланін, очищений за допомогою пористої адсорбційної смоли, а також домішки, переважно макромолекули, такі як ліпіди, білки і полісахариди, або кольорові компоненти, які поєднані з макромолекулами або включені в макромолекули. Домішки мають більшу молекулярну масу, ніж тейкопланін. Причина, чому домішки в основному складаються з макромолекул, полягає в тому, що продукти метаболізму з низькою молекулярною масою та компоненти, що утворюються в культуральному середовищі, в основному видаляються пористою адсорбційною смолою. Тому для видалення високомолекулярних сполук застосовується ультрафільтрація.

Ультрафільтраційна мембрана, яка використовується в процесі ультрафільтрації має граничну молекулярну масу від 3000 до 10000 Да. Після ультрафільтрації розчин концентрують за допомогою вакуум випаровування, та ліофільно сушать з отриманням порошку тейкопланіну [36].

## 2.5 Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Антимікробна дія тейкопланіну бактерицидна по відношенню до грампозитивних патогенів. Тейкопланін діє шляхом зв'язування з N-Lys- D - Ala- D - Ala-кінців ПГ і його попередника ліпіда II. Це зв'язування ефективно проти роботи ключових ферментів, критичних для синтезу клітинної стінки: трансглікозилаз, які переносять субодиниці N- ацетилмурамової кислоти, N- ацетилглюкозамін пентапептида від ліпіда II до закріпленої клітинної стінки і, D-транспептидаз, які зшивають ланцюги ПГ.

В результаті дії антибіотика порушується нарощування пептидоглікана та жорсткість клітинної стінки. Як наслідок блокується поділ клітин і послаблюється клітинна стінка, що призводить до загибелі клітин. Цей спосіб дії, націлений на біохімічно складну клітинну стінку грампозитивних бактерій, який дозволяє уникнути швидкого виникнення резистентності за рахунок інактивації транспортних систем, порушення функціонування транспортних білків або мутацій в цільових ферментах, ефективно усуваючи три загальні механізми стійкості до антибіотиків [37].

Тейкопланін володіє рядом переваг перед ванкоміцином (табл. 3.1) :

- більша ефективність проти грам-позитивних патогенів;
- довший період напіввиведення (40 год порівняно з 4-5 год ванкоміцину) ;
- менша токсичність

Перелічені переваги забезпечуються особливостями хімічної структури тейкопланіну: глікозилювання зумовлює «непомітність» тейкопланіну для більшості сенсорних гістидин-кіназ із *van*-кластерів; наявність аліфатичного бічного ланцюга спричиняє закорювання тейкопланіну в клітинній мембрані, а також надає сполуці більшої ліпофільності, що забезпечує кращу тканинну проникність і довгий період напіввиведення [38]. В таблиці 2.1 наведена порівняльна характеристика тейкопланіну та ванкоміцину.

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						33
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Таблиця 2.1 Порівняльна характеристика тейкопланіну і ванкоміцину [9]

Показник	Тейкопланін	Ванкоміцин
Антимікробна активність in vitro	Більш висока по відношенню до <i>S.aureus</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i>	Більш висока по відношенню до коагулазонегативних стафілококів
Резистентність стафілококів	Можливий розвиток стійкості	Можливе зниження чутливості
Резистентність ентерококів	Деякі штами зберігають чутливість до тейкопланіну	Кількість резистентних ентерококів зросла в декілька разів за останні роки

Швидкість метаболізму тейкопланіну в організмі незначна (близько 3%), він повністю виводиться нирковими механізмами. В середньому, дослідження, в яких тривалість відбору проб становить 3 тижні після останньої дози, показали, що період напіввиведення тейкопланіну буде 155-168 годин після внутрішньовенного введення і через 182 години після внутрішньом'язової ін'єкції [39].

При взаємодії молекули антибіотика із ПГ клітинної стінки біктеріальної клітини тейкопланін приймає вигнуту конформацію, при цьому N- і С-кінці антибіотика закриваються навколо ПГ-мішені (рис. 2.4). Манноза, приєднана до амінокислоти 7 на С-кінці антибіотика, взаємодіє з гідроксильною групою в бічному ланцюзі амінокислоти 1 на N-кінці молекули, утворюючи водневий зв'язок; бічні ланцюги амінокислот 1 і 7 разом з манозою утворюють «дно» молекули тейкопланіна [40].

Тейкопланін утворює п'ять водневих зв'язків, які зв'язують його із ПГ. На додаток до утворення цих водневих зв'язків, тейкопланін охоплює ПГ, захищаючи його від розчинника. Внутрішня поверхня молекули тейкопланіну, утворена бічними ланцюгами залишків амінокислот 2, 4 і 6, екранує одну

сторону пептидного ліганда; бічний ланцюг залишку амінокислоти 1 частково екранує протилежну поверхню 3-кінцевій частині ліганду [40].

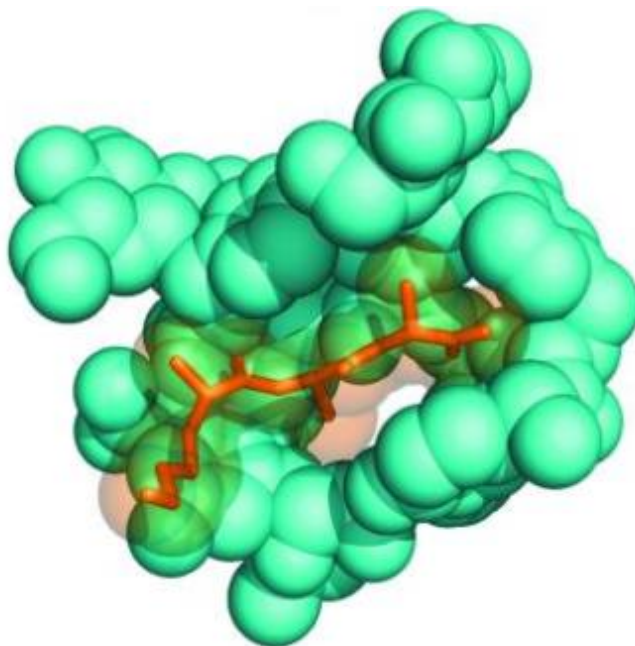


Рисунок 2.4 Взаємодія молекули тейкопланіну з пептидогліканом. Тейкопланін (зелений) показаний у вигляді сфери, а пептидний ліганд (помаранчевий) [40].

У структурі тейкопланіну додаткове екранування забезпечується глюкозаміновим цукром, приєднаним до амінокислоти 4 антибіотика, атом С5 якого контактує по Ван-дер-Вальсу з бічним ланцюгом С-кінцевого залишку d-Ala ліганда. Бічний ланцюг залишку лізину не взаємодіє з антибіотиком, так само як і будь-яка частина пептидного ланцюга вище цього залишку [40].

## РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

### 3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту

Біосинтетичний кластер генів тейкопланіну (*tei*) (рис. 3.1) *A.teichomyceticus* був секвенований і анотований незалежно двома групами вчених у 2004 році [41,42].

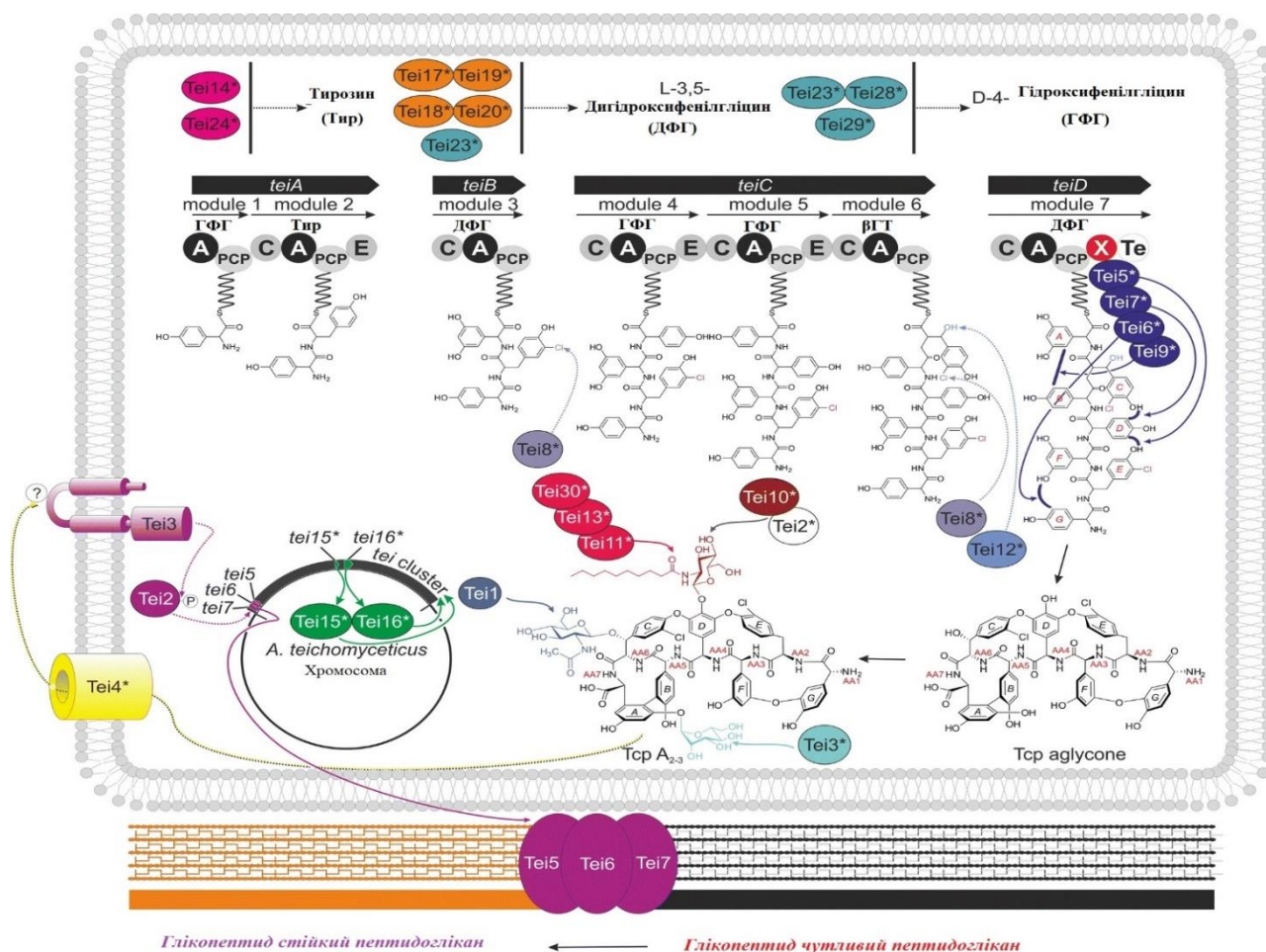


Рисунок 3.1 Біосинтетичний кластер генів тейкопланіну [44].

Довжина кластера *tei* становить 89976 п.н., містить 49 відкритих рамок зчитування, організованих в 18 транскрипційних одиниць, починаючи з *tei1* \* і закінчуючи *tei31* \*. Більшість генів *tei* активно транскрибуються в умовах

					ДП 6211. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив	Михальчук В. В				РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	Стадія	Арк.
Консульт.							Акрушів
Керівник	Тодасійчук Т. С					36	102
Затвер.						КПІ ім. І.Горького ФБТ	

продукування тейкопланіна. Єдиними винятками являються *tei25* \*, *tei26* \*, *tei27* \* і *tei31* \* (кодують металогідролазу, хоризмат мутаду типу II, білок який взаємодіє з сидерофором і регулятор транскрипції, відповідно), які, як було встановлено, не беруть участі у синтезі тейкопланіна [43].

Від *tei11* до *tei1* відкриті рамки зчитування зліва від генів НРПС, далі йдуть гени НРПС: *teiA* – D. Границями кластера біосинтезу тейкопланіну прийнято вважати *tei8* та *tei31*\*, причетність інших відкритих рамок зчитування до біосинтезу тейкопланіну малоімовірна. До складу кластера біосинтезу тейкопланіну входять як поліцистронні, так і моногенні транскрипційні одиниці. Функції більшості генів біосинтезу тейкопланіну, можуть бути передбачені за їх ортологією до досліджених генів біосинтезу інших глікопептидних антибіотиків. У біосинтезі непротеїногенних амінокислот задіяні продукти генів *tei28*\*, *tei29*\*, *tei23*\* (біосинтез ГФГ), *tei17*\*- 20\* (ДФГГ), *tei12*\* (Гтир). Гени *tei14*\* та *tei24*\* можуть відігравати роль у забезпеченні біосинтезу тейкопланіну Тир [41].

Генетичний апарат, що кодує ферменти, необхідні для циклізації лінійного гептапептиду, це: *tei5*\*, 7\*, 9\*, 6\*, які кодують ортологів ОхуА, ОхуВ, ОхуС та ОхуЕ відповідно. Кластер біосинтезу тейкопланіну містить лише один ген, що кодує галогеназу – *tei8*\*. Гени, які задіяні в процесах глікозилювання та ацилювання тейкопланінового аглікону — це *tei1*, 10\*, 3\* (кодують глікозилази), *tei11*\*, 13\*, 30\* (їх продукти можуть бути задіяними в приєднанні бічних аліфатичних радикалів). Експорт тейкопланіну – АВС-транспортером, кодується геном *tei4*\*. В кластері біосинтезу тейкопланіну присутні три гени, що кодують шлях-специфічні регулятори: *tei15*\*, *tei16*\* та *tei31*\* [44].

Потребу в тирозині забезпечують два гени шляху шикимат: 3-дезоксид-арабіно-гептулозонат-7-фосфат синтаза (*Tei14*\*) і префенатдегідрогеназа (*Tei24*\*). Біосинтез D-4-ГФГ, регулюється *Tei23* \*, *Tei28* \* і *Tei29* \*, які є ортологами НргТ (p-гідроксифенілгліцинтрансамінази), НmaS (4-гідроксиманделатсинтази) і Нmo (гідроксиманделатоксидази) [45]. Біосинтез

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						37
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

L-гідроксиманделат з гідроксифенілпірувата може каталізувати Tei28 \*, з подальшим перетворенням L-гідроксиманделата в гідроксибензоїлформіат, що каталізує Tei29 \*. Утворення L-ГФГ з гідроксибензоїлформіата каталізується Tei23 \*. Хоча L-ГФГ утворюється безпосередньо з тирозину, останній також може служити донором амінів в реакції, що каталізується Tei23\* [46].

До складу аглікону тейкопланіну входять три цукри і один ліпідний ланцюг, для перетворення його в зрілий ліпоглікопептид необхідно три глікозилтрансферази (Tei1, Tei3 і Tei10 \*) і одна ацилтрансфераза (Tei11 \*) кодується в *tei* [46]. Дослідження показують, що адаптація тейкопланіна починається з Tei10 \* який каталізує перенесення N-ацетилглюкозамін на 4-гідроксильну групу 4-ГФГ з використанням уридиндифосфо-N-ацетилглюкозамін в якості донора цукру. Потім він деацетилюється Tei2 \*, деацетилазою, з утворенням глюкозамінного фрагмента. Потім Tei11 \* переносить ацильний ланцюг на вільну аміногрупу глюкозамінного фрагмента, використовуючи ацил-кофермент А в якості донора. Гнучкість субстрату Tei11 \* пояснює утворення безлічі конгенерів тейкопланіна, які розрізняються по довжині ацильного ланцюга [41].

Біохімічний аналіз показав, що Tei1 переносить N-ацетилглюкозаміновий фрагмент в  $\beta$ -гідроксильну групу  $\beta$ -гідрокситирозина. Окрім основних адаптивних білків були ідентифіковані два білка, пов'язані з біосинтезом тейкопланіна, але вони не є необхідними: Tei13 \* (ацил-КоА-синтетаза) і Tei30 \* (тіоестераза). Проте, недавній аналіз показує, що Tei30 \* може альтернативно функціонувати як «коригуюча» тіоестераза типу II, яка видаляє амінокислоти, які не є субстратами для НРПС. Актиноміцети, які продукують ГПА, є грампозитивними бактеріями і потребують розробки специфічних механізмів саморезистентності до вироблених антибіотиків. Як і патогенні коки, стійкість до ГПА у більшості актиноміцетів опосередковується експресією генів *vanRS* - *vanHAX*. Відомо, що ортологи *vanHAX* у *A. teichomyceticus* — *tei7-6-5*, частина біосинтетичного кластера

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						38
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		



генів *tei*, їх транскрипція є визначальною в культурах, які продукують тейкопланін. Ортологи *vanRS* *tei2-3* утворюють один оперон, експресія якого, контролюється специфічним для шляху регулятором *Tei15* \*, який контролює продукцію тейкопланіну. Подібно ГПА-резистентних ентерококів і стафілококів, *tei7-6-5* (*vanHAX* ортологи) спільно транскрибуються в *A. teichomyceticus*. Згідно з опублікованою послідовністю *tei*, ген *tei4* розташований в тому ж ланцюзі, що і *tei2-3*, на 112 п.н. нижче від *tei3*. Ген *tei4* кодує дигідрофолатредуктазу, яка не впливає на стійкість до глікопептиду. Ген *tei8*, що кодує передбачуваний MurF-подібний білок, знаходиться в тому ж ланцюзі, що і *tei7-6-5*, на 198 п.н. вище *tei7*. Було підтверджено, що гени *tei7-6-5* транскрибуються, але не з *tei8*. Гени *tei2-3* транскрибуються спільно з *tei4*, утворюючи оперон з трьох генів (рис. 3.2) [47].

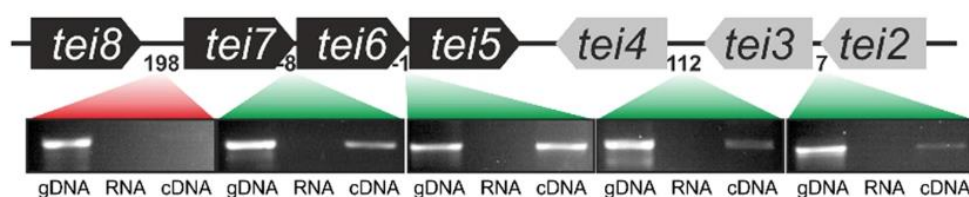


Рисунок 3.2 Організація генів стійкості *A. teichomyceticus* до тейкопланіна. Гени *tei7-6-5* є ортологами *vanHAX*, *tei8* кодує MurF-подібний білок, *tei4* — кодує дигідрофолатредуктазу, а *tei3-2* — *vanS/vanR* ортологи [47].

### 3.2 Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту

При отриманні нового продуцента антибіотика важливо враховувати економічний ефект від впровадження його в практику. Іноді збільшення виходу антибіотика від 10% до 20% може виявитися економічно невигідно, якщо нові умови культивування потребуватимуть застосування більш дорогого середовища або більш жорстких умов регулювання процесу. Отже, для збільшення виходу потрібних антибіотиків істотну роль грають: селекція найбільш активних штамів і вивчення умов їх культивування [48].



Традиційними методами селекції є ступінчате клонування, індукований мутагенез з відбором випадкових мутантів, відбір за фенотипом, відбір за кількісною ознакою серед мутантів з певним генотипом, гібридизація [49]. Отримання промислових штамів мікроорганізмів довгий час ґрунтувалося на внесенні в геном клітини індукованих мутацій і відборі кращих варіантів. Цей метод дуже трудомісткий і може займати тривалий час. Однак його використання призводить до значного збільшення рівня продукції метаболіту.

Стратегія селекційної роботи з мікроорганізмами полягає в пошуку природних форм, які володіють будь-якими корисними для людини властивостями (синтез цінних сполук, висока швидкість росту, здатність до засвоєння дешевих і доступних субстратів), а також подальшому їх поліпшенні, створенні на їх основі промислових штамів. Це завдання вирішується зазвичай шляхом зміни регуляції метаболічної активності клітини. Сучасні тенденції розвитку селекції продуцентів — конструювання промислових штамів із заданими властивостями з використанням новітніх досягнень фундаментальних галузей біології в поєднанні з прийомами класичної селекції [50].

### **3.2.1 Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів**

Важливу роль у збільшенні виходу антибіотиків грають умови культивування — склад середовища, аерація, температура. Так, підбір оптимального середовища для кожного отриманого в процесі селекції продуцента іноді дає можливість збільшити вихід антибіотика в 3 і більше разів. Зазвичай з виділенням нового варіанту продуцента антибіотика досить різко змінюється його вимогливість до умов культивування: умови аерації середовища, температура культивування, подовжується період процесу синтезу антибіотика, можуть змінюватися і інші параметри [48].

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						40
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Оптимізація умов ферментації є одним із способів поліпшення продукції тейкопланіна. Першим проривом у виробництві тейкопланіна стало відкриття того, що додавання валіна в поживне середовище різко збільшило виробництво основного компонента, що несе розгалужений ланцюжок насичених кислот з десятима вуглецьми (рис. 3.3) [51].

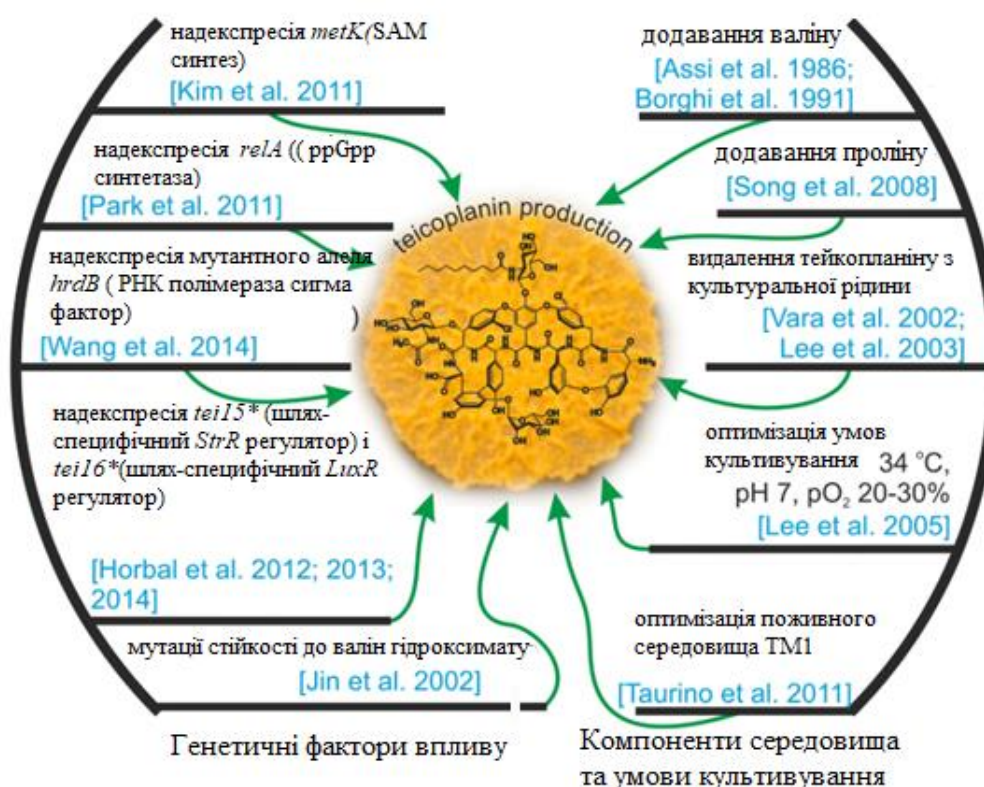


Рисунок 3.3 Перелік основних генетичних факторів та умов культивування, які позитивно впливають на продукцію тейкопланіну у *A. teichomyceticus* [54]

В ході наступних робіт, стало ясно, що кожен з п'яти основних компонентів комплексу тейкопланіну можна модулювати шляхом додавання олій, що містять лінійні жирні кислоти і / або розгалужені амінокислоти, які є відповідно пусковими механізмами для лінійних і розгалужених жирних кислот, включених в тейкопланін [18]. Інші автори повідомили, що добавка проліна збільшувала продукцію тейкопланіна в масштабі ферментера приблизно в п'ять разів [52], а в багатому на гліцерин середовищі продукується в три рази більше, ніж в не гліцериновому середовищі (рис. 3.3) [53].

Оскільки антибіотик пригнічує ріст штаму-продуцента при низьких концентраціях (близько 25 мг / л), штам-продуцент повинен використовувати механізм стійкості, щоб уникнути згубного впливу на ранніх етапах виробництва ГПА; в іншому випадку клітини перестають рости. Видалення продукованого тейкопланіну під час експоненційної фази росту шляхом безперервного культивування [55] або шляхом додавання тейкопланін-захоплюючої смоли під час ферментації (рис. 3.3) [56] сприяє виробленню антибіотику і переходу від експоненціальної фази в стаціонарну, коли стійкість більше не потрібна і не проліферуючі клітини стійкі до високих концентрацій власного продукту.

### 3.2.2 Використання індукованого мутагенезу

Спонтанні мутації виникають з низькою частотою (близько  $10^{-5}$ - $10^{-6}$ ), ця можливість повинна враховуватися при виборі продуцентів. Для того щоб відібрати такі мутанти, необхідно проаналізувати величезну кількість клонів на предмет метаболічних відхилень які нас цікавлять. У селекції продуцентів найбільший інтерес представляють індуковані мутанти.

Серед фізичних агентів використовуються УФ-опромінення і радіація. УФ-опромінення викликає димеризацію піримідинів і є мутагеном широкого спектру дії. Використання цього мутагена призводить до утворення мутантів з транзиціями, трансверсіями і делеціями. Ефективність УФ-опромінення досить висока, проте висока частота мутацій досягається за рахунок низької виживаності клітин. Крім того, такі мутанти добре відновлюються репараційними механізмами клітин. Більш широке застосування знайшли хімічні мутагени: аналоги основ, азотиста кислота, нітрозогуанідин, етилметансульфонат, акридинові барвники. Аналоги основ викликають транзиції і трансверсії в результаті помилок реплікації [50].

В результаті проведення індукованого мутагенезу представників *Streptomyces* було отримано ряд високопродуктивних продуцентів. Деякі з них наведені в таблиці 3.1.

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						42
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Таблиця 3.1 Продуценти антибіотиків отримані шляхом індукованого мутагенезу [57-60].

Продуцент	Антибіотик	Мутагенний чинник
<i>Streptomyces lincolnensis</i>	Лінкоміцин	УФ-випромінювання етилметансульфонат
<i>Streptomyces hygroscopicus</i> R13-29	Рапаміцин	УФ-випромінювання
<i>Amycolatopsis orientalis</i> E 13-26	Еремоміцин	Метилнітрозогуанідин УФ-випромінювання
<i>Streptomyces griseus</i>	Стрептоміцин	УФ-випромінювання
<i>Streptomyces nodosus</i>	Амфотерицин	УФ-випромінювання
<i>Streptomyces noursei</i>	Ністатин	УФ-випромінювання
<i>Streptomyces urnbrinus</i>	Діоміцин	Метилнітронітрозогуанідин
<i>Streptomyce prasinus</i>	Прасіноміцин	Метилнітронітрозогуанідин УФ-випромінювання

*A. teicomyceticus* піддавався дії метилнітронітрозогуанідину (НТГ) та УФ-мутагенезу. Ряд колоній, отриманих обробкою НТГ батьківського штаму, попередньо піддавали скринінгу, спори обраних колоній опромінювали ультрафіолетом. Швидкість виживання батьківського штаму після обробки НТГ протягом 1 години і УФ-випромінюванням протягом 120 с складала 40% і 0,1% відповідно. Один такий мутант, продукував 65 мг тейкопланіну. Це було в 3 рази вище, ніж у вихідного штаму, який продукував менше 20 мг тейкопланіну. Морфологічно вихідні спори були змінені з 5-7 мкм до 20-25 мкм, а колір повітряного міцелію змінився з коричневого на рожевий [61].

### 3.2.3 Регуляція метаболізму у мікробній клітині

У актиноміцетів морфологічна диференціація і вторинний метаболізм тісно координуються за допомогою складних регуляторних ланцюгів, що реагують на сигнали навколишнього середовища. Компоненти цих ланцюгів

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						43
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

можуть бути використані в якості інструментів для поліпшення виробництва антибіотиків.

Перспективним являється отримання нових антибіотиків шляхом створення генно-інженерних продуктів, зокрема рекомбінантних штамів продуцентів шляхом введення плазмідної ДНК. Додавання поліетиленгліколя полегшує проникнення плазмідної ДНК в протопласти *Streptomyces*. Після трансформації протопласти спочатку висівають на тверде середовище, щоб утворилася клітинна стінка, далі для відбору трансформовані клітини переносять на селективне середовище, яке містить неоміцин, чи тіострептон [6].

Плазміда *Streptomyces*, pIJ2303, що несе фрагмент хромосомної ДНК *S. coelicolor* довжиною 32,5 т.п.н., містить гени ферментів, які відповідають за біосинтез антибіотика актинородина. Цю плазмиду вводили або в штам AM-7161 *Streptomyces sp.*, який синтезує подібний антибіотик медерміцин, або в штами B1140 або Tu22 *S. violaceoruber*, які синтезують також родинні антибіотики гранатіцин і дигідрогранатіцин. Кожен з 4-х антибіотиків формує різний рН і відповідно колір культурального середовища. Після трансформації штамів AM-7161, B1140 і Tu22 плазмідною, яка містить гени, що кодують ферменти необхідні для біосинтезу актинородина, з'являється характерне забарвлення. Трансформанти штаму AM-7161 *Streptomyces sp.* і штаму B1140 *S. violaceoruber*, які містять плазмиду pIJ2303, синтезують антибіотики, що кодуються як плазмидною, так і своєю хромосомної ДНК.

В результаті трансформації штаму Tu22 *S. violaceoruber* плазмідною pIJ2303 разом із актинородином починає синтезуватися новий антибіотик — дигідрогранатиродін, а в результаті трансформації штаму AM-7161 *Streptomyces sp.* плазмідною pIJ2315 синтезується новий антибіотик — медеродін А. дослідивши та вивчивши біохімічні та генетичні складові біосинтезу полікетидного антибіотика еритроміцину в клітинах *S. erythraea*, вдалося внести специфічні зміни в гени, що асоційовані з біосинтезом даного

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						44
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

антибіотика, а також синтезувати похідні еритроміцину, що володіють іншими властивостями.

Для початку визначили первинну структуру фрагменту ДНК *S. erythraea* довжиною 56 т.п.н., до складу якого входить кластер генів *ery*. Далі двома способами модифікували фермент еритроміцин полікетидсинтазу. Для цього або видаляли ділянку ДНК, що кодує бета-кеторедуктазу, або вносили зміни в ділянку ДНК, що кодує еноілредуктазу. Дані експерименти показують, що якщо ідентифікувати та охарактеризувати кластер генів, що відповідає за кодування ферментів біосинтезу певного антибіотика, то, вносячи в них специфічні зміни, можна буде змінювати його структуру. Окрім того, вирізаючи та поєднуючи ті чи інші фрагменти ДНК, можна переміщати домени фермента полікетидсинтази та отримувати нові полікетидні антибіотики [62].

Одним із ефективних шляхів впливу на геном актиноміцетів – протопластування клітин. Метод зливання протопластів різних штамів може служити способом отримання рекомбінантів, які здатні синтезувати новий антибіотик, чи володіти більш високим рівнем антибіотичної активності. Протопласти отримують наступним чином: міцелій відмивають від поживного середовища, центрифугують, проводять лізис в поживному середовищі яке містить 20% сахарозу і лізоцим в концентрації 1-2 мг/мл, не лізований матеріал відділяють центрифугуванням при 1000 об/хв, протопласти осаджують шляхом центрифугування при 3000 об/хв, протопласти висівають на поживне середовище та інкубують.

Застосовуючи методи роботи генної інженерії можна не лише створювати нові антибіотики, але і збільшувати синтез уже існуючих. Обмежуючим фактором в промисловому виробництві антибіотиків культурами *Streptomyces sp.* як правило є кількість доступного для клітин кисню. Застосовуючи методи генної інженерії, можна створювати штами *Streptomyces*, які здатні ефективніше використовувати наявний в середовищі кисень.

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						45
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Аеробна бактерія *Vitreoscilla sp.* здатна синтезувати гомодимерний гемвмісний білок, який функціонально подібний до еукаріотичного гемоглобіну. Ген «гемоглобіну» *Vitreoscilla* був виділений та вбудований у плазмідний вектор *Streptomyces* та введений у клітини цього мікроорганізму. Трансформовані клітини *S. coelicolor*, що ростуть за низької концентрації розчиненого кисню, здатні синтезувати в 10 разів більше актинородина на 1 г сухої клітинної маси та мають велику швидкість росту, в порівнянні із нетрансформованими. Даний спосіб генетичної маніпуляції можна застосовувати й для інших мікроорганізмів, які ростуть в умовах нестачі кисню [6].

Маніпуляції з *A. teichomyceticus* з геном SAM синтази у *metK* привели до поліпшення продукції антибіотиків різними штамми. Надекспресія *metK* у *A. teichomyceticus* збільшила продукцію тейкопланіна більш ніж у два рази [61] (рис. 3.3). Аналогічно, надлишкова експресія ортолога *A. teichomyceticus* (р) ppGpp-синтетази *relA* збільшувала продукцію тейкопланіна в 3 рази (рис. 3.3) [64].

Застосування гетерологічних генів *hrdB* (кодують основний  $\sigma$  фактор РНК-полімерази) для поліпшення продукції тейкопланіну є одним із прикладів транскрипційної інженерії у *A. teichomyceticus*. В цьому випадку випадковий мутагенез був виконаний на ряді гетерологічних генів *hrdB*, що походять з *Micromonosporaceae*. Ця колекція мутантних алелів *hrdB* потім була експресована в *A. teichomyceticus* під контролем *ermEp*. Серед отриманого набору штамів мутантний надпродуцент перевищував продукцію тейкопланіну у *A. teichomyceticus* більш ніж в два рази [65].

### 3.3 Схема отримання продуцента

Штами мікроорганізмів, які використовуються у виробництві, повинні бути технологічними, а саме:

- володіти високою продуктивністю;
- фагостійкістю;

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						46
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- генетичної стабільністю;
- рости на рентабельних (дешевих і доступних) субстратах;
- не токсичними [50].

Для отримання промислового продуцента тейкопланіна *A. teichomyceticus* BNG 2315 була використана наступна схема селекції [66]:

1. Підготовка вихідного штаму *A. teichomyceticus* BNG 23 до селекційної роботи.

А) На підготовчому етапі вивчається природна мінливість продуцента за рівнем продукції тейкопланіну, і паралельно — по найбільш помітним морфологічним ознакам, тобто ознаками колоній або міцелію. Розміри колоній, отриманих на вівсяному агаризованому середовищі, становлять 3-4 мм в діаметрі. Форма колоній *A. teichomyceticus* BNG 23 вупукла з чітко окресленими і правильними контурами блідо-оранжевого кольору. Колір повітряного міцелію від світло-оранжевого до темно-оранжевого. Колір вегетативного міцелію світло-коричневий на картопляному середовищі, знежиреному молоці і на середовищах з дріжджовим агаром. Добре розвинений повітряний міцелій, що складається з довгих гіф.

Б) «Чистка» культури. Музейну культуру висівають на чашки Петрі із агаризованим середовищем (вівсянка 1,5%, крохмаль 1,0%, агар 2,0%). Інкубують за температури 30 °С, протягом 4 діб. Серед не менше 100 клонів вихідного штаму, з типовою для даного виду морфологією, вибирають один клон, що володіє найбільш високим (по відношенню до вихідного штаму) і відтвореним при пересіві рівнем продукції антибіотика.

В) Стабілізація культури. Обраний клон з найбільш високим рівнем продукування розсівають не менше 100 субклонів на чашках Петрі, і оцінюють за рівнем продукції за діаметром зони пригнічення росту тест-культури *B. subtilis*. Значення рівнів продукції таких субклонів виражають в % по відношенню до рівня продукції батьківського клону і розподіляють у вигляді варіаційного ряду. Із обраним клоном повторюють процедуру розсівання, оцінки продуктивності та побудови варіаційного ряду. Порівнюють значення

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						47
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		



двох отриманих варіаційних рядів. Якщо ці значення достовірно не розрізняються, можна закінчити підготовку культури, залишивши субклон з високим рівнем продукції їх першого варіаційного ряду. Завданням ступінчастого клонування є стабілізація вихідної культури за кількісною ознакою, отримання найбільш однорідної за даною ознакою популяції.

2. Отримання мутантів. В якості мутагенного чинника використовується УФ-випромінювання з довжиною хвилі 254 нм. Процес обробки відібраного клону проводять наступним чином. Культуру *A. teichomyceticus* BNG 23 культивують на скошеному вівсяному агарі при 32 ° С протягом 12 днів. Далі до культури додають сольовий буфер, енергійно перемішують, потім суспензію фільтрують. Суспензію спор піддають УФ-випромінюванню за допомогою УФ-лампи 30 Вт протягом 120 с і залишають при температурі 4 ° С протягом 2 годин в темряві.

3. Відбір клонів з підвищеним рівнем синтезу тейкопланіну. Отриману після обробки мутагеном суспензію спор висівають на щільне поживне середовище інкубують при 32 ° С протягом 7 днів. Далі визначається відсоток виживання (1%). Після отримання моноколоній аналізується їх продуктивність після проведення мутагенезу і порівнюється з музейною культурою. Моноколонії продуценту висівають на щільне середовище на чашках Петрі з попередньо засіяною тест-культурою *B. subtilis* та інкубують при 32 °С протягом 18 годин. Колонії, які утворюють максимальну зону пригнічення росту тест-культури, порівняно із вихідною культурою відбирають.

4. Стабілізація штаму. Відібрані штами піддають стабілізації, так як описано в 1В для отримання однорідної популяції.

5. Отримання промислового продуцента *A. teichomyceticus* BNG 2315. Отриманий штаму культивують в малому ферментері із середовищем ТМ1 протягом 7 днів за температури 30 °С . Визначають продуктивність штама шляхом ВЕРХ.

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						48
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Таким чином був отриманий промисловий продуцент тейкопланіну — *A. teichomyceticus* BNG 2315. Його продуктивність становить 3, 2 г/л, що у 60 раз більша в порівнянні штамом *A. teichomyceticus* BNG 23.

Схема отримання промислового продуцента наведена на рис. 3.4.

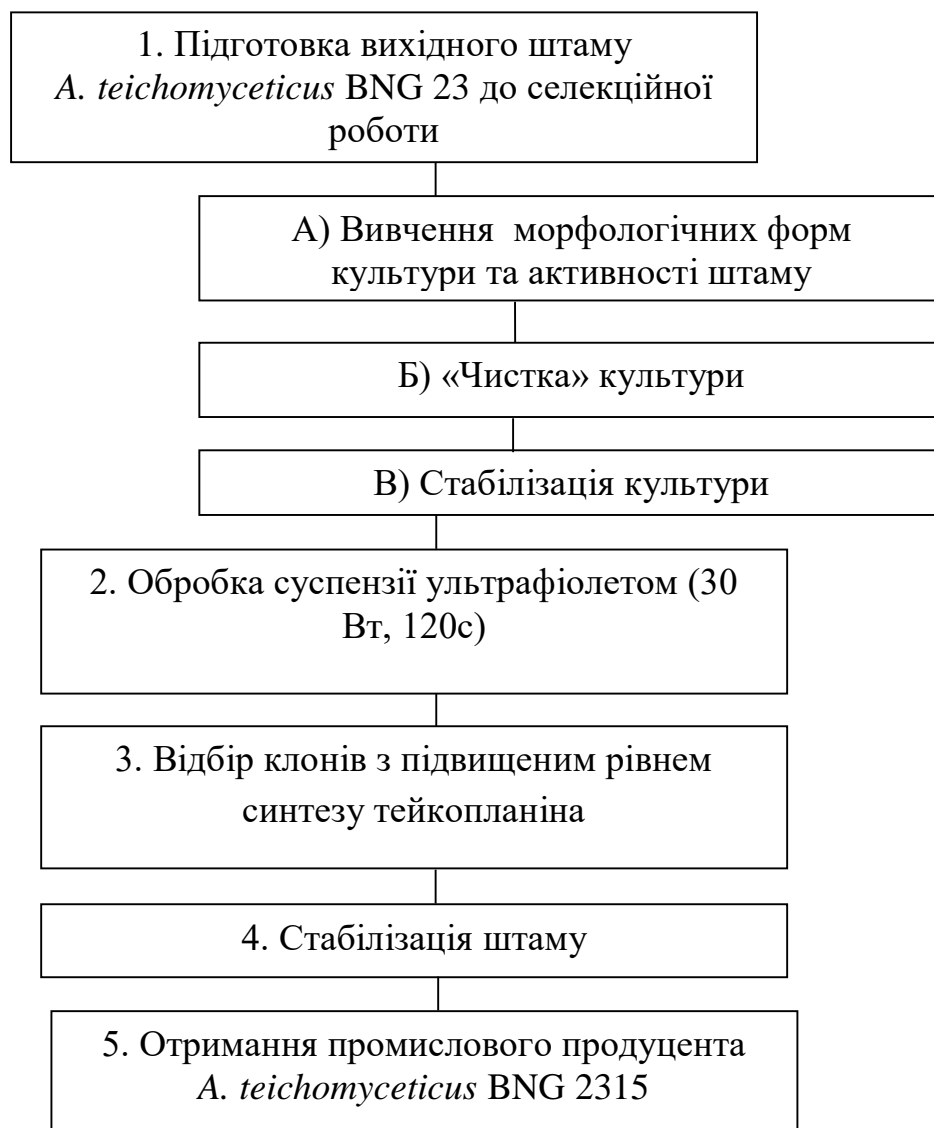


Рисунок 3.4 Схема отримання промислового продуцента *A. teichomyceticus* BNG 2315 [66].

## РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

### 4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва

Кінцевий продукт являє собою активний фармацевтичний інгредієнт (АФІ) антибіотика тейкопланіну. Продукт випускається у вигляді порошку, який фасується у поліетиленові пакети масою 1 кг. Основною сферою призначення АФІ – субстанція для фармацевтичної промисловості. Вміст основної речовини тейкопланіну – 95%, вміст домішок не більше – 5%. Основні фізико-хімічні властивості продукту наведені в таблиці 4.1 [67].

Таблиця 4.1 Основні фізико-хімічні властивості продукту [67].

Показник	Норма
Зовнішній вигляд	жовтуватий, аморфний порошок
Склад	1. група тейкопланіну А2: мінімум 80,0%; <ul style="list-style-type: none"><li>група тейкопланіну А2-2: від 35,0% до 55,0%;</li><li>група тейкопланіну А2-1: максимум 20,0%;</li><li>група тейкопланіну А2-3: максимум 20,0%;</li><li>група тейкопланіну А2-4: максимум 20,0%;</li><li>група тейкопланіну А2-5: максимум 20,0%;</li></ul> 2. група тейкопланіну А3: максимум 15,0%;
Розчинність	розчинний у воді, помірно розчинний в диметилформаміді, не розчиняється в етанолі
рН	Від 6,5 до 7,5
Хлориди	максимум 5,0%, у вигляді хлориду натрію
Важкі метали	максимум 20 проміле
Домішки	1,25: максимум 5,0%;
Мікробіологічна характеристика	Не стерильний

					ДП 6211. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Михальчук В. В			РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА  ЧАСТИНА	Стадія	Арк.	Аркушів
Консульт.							50	102
						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівник		Тодосієвичук Т. С						
Затвер.								

Пакування, маркування, транспортування і зберігання препарату здійснюється згідно з ГОСТ 17768-90. Готовий продукт фасують в сухі, чисті поліетиленові пакети по ДСТУ 7275:2012, масою нетто 1 кг з подальшою упаковкою в картонні коробки по ДСТУ 7276:2012. Допустимі відхилення маси нетто  $\pm 1,5\%$ .

Шви поліетиленових пакетів повинні бути термозапаяні. Картонні коробки заклеюються поліетиленовою стрічкою ГОСТ 200477-86.

На первинній упаковці вказують:

- «Україна»;
- назву підприємства та адресу;
- товарний знак;
- назву продукту;
- номер серії;
- термін придатності;
- умови зберігання.

Транспортне маркування проводять згідно з ГОСТ 14192-96 на картонну коробку наноситься знак «Берегти від вологи» та маркування, що характеризує продукцію:

- назва продукції
- дата виготовлення
- назва та адреса виробника
- номер серії продукції
- умови зберігання
- кількість пакувальних одиниць
- умови транспортування

Готову продукцію зберігають в сухому приміщенні при температурі не вище 25 ° С [67, 68, 69].

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						51
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

## 4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві

Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів наведена в таблиці 4.2.

Таблиця 4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Найменування	Категорія та номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
1. Основна сировина			
1.1 Глюкоза кристалічна гідратна	ДСТУ 4464:2005	Прозорість н/м 97,5 %, кольоровість 0,02 ОД, патогенні мікроорганізми, в тому числі бактерії роду <i>Salmonella</i> , не допускаються	Компонент ПС
1.2 Дріжджовий екстракт	ДСТУ 4657:2006	Колір від світло-жовтого до жовтого, вміст сухих речовин $\geq 94,0$ %	Компонент ПС
1.3. Кальцій карбонат	ГОСТ 4530-76	Масова частка вуглекислого кальцію, не менше 99%, масова частка нерозчинних у соляній кислоті речовин, н/б 0,003%	Компонент ПС
1.4. Соевий шрот	ДСТУ 4593:2006	Колір від білого до кремового, масова частка вологи та летких речовин 8,5—10,0%	Компонент ПС
2. Допоміжні речовини			

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП 6211. 00.000 ПЗ

Арк.

52

Продовження таблиці 4.2

1	2	3	4
2.1 Вода питна	ДсанПіН №383(186/1940)	Число бактерій н/б 100 КУО/см <sup>3</sup> , бактерій групи кишкової палички н/б 3 КУО/дм <sup>3</sup>	Для приготування миючих , дезінфікуючих розчинів, ПС
2.2. Кислота соляна	ДСТУ 2904-94	Прозора безбарвна чи жовтувата рідина, масова частка хлористого водню, 35%	Для регулювання кислотності
2.3 Метанол технічний марки А	ДСТУ 3057-95	Безбарвна прозора рідина без нерозчинних домішок, масова частка основної речовини 99,95%	Для елюювання антибіотика
2.4 Мило рідке з дозатором	ДСТУ 2161:2010	Однорідна однофазна або багатофазна рідина без сторонніх домішок, водневий показник 3,5-8,5	Для миття рук
2.5 Засіб миючий синтетичний і порошкоподібний	ГОСТ 25644-98	Гранульований порошок від білого до світло-жовтого кольору, масова частка фосфорнокислих солей н/б 22 %	Для мийки обладнання
2.6 Натр їдкий технічний	ГОСТ 2263-79	Безбарвна прозора рідина, масова частка основної речовини н/м 46%	Для визначення кислотності, нейтралізації стічних вод
2.7 Пероксид водню	ГОСТ-177	Масова частка пероксиду водню – 6%	Дезінфікуючий розчин
2.8 Спирт етиловий ректифікований	ДСТУ 4221:2003	Масова частка спирту 96%	Для приготування дез. розчинів

Продовження таблиці 4.2

1	2	3	4
3. Матеріали			
3.1 Високоєфективні повітряні фільтри HEPA	ДСТУ EN 1822-1-2001	Фільтри повинні бути стійкими до впливу зовнішніх факторів при експлуатації, ефективність 99,995%	Очистка повітря
3.2 Коробки картонні	ДСТУ 7276:2012	Зовнішній вигляд, основні розміри	Для групового упакування первинної тари
3.3 Пакети поліетиленові	ДСТУ 7275:2012	Зовнішній вигляд, цілісність	Для упакування готового продукту
3.4 Папір етикеточний	ГОСТ 7625-86	Марка А 1м <sup>2</sup> 70-80 г	Для маркування
3.5 Папір лабораторний фільтрувальний	ТУ 2642-001- 4262224157-98	Маса золи одного фільтра г: 0,0002- 0,0005	Для лабораторних робіт
3.6 Стрічка клейка	ГОСТ 20477-86	Стрічка не повинна мати тріщин, складок, розривів, товщина клейового шару 0,018-0,030 мм	Для упаковки групової тари
3.7 Тканини бавовно-паперові та змішані побутові	ГОСТ 29298-92	Ступінь стійкості фарбування- стійкий, розривне навантаження смужки 342 кгс	
3.8 Фарба штемпельна	ТУ 6-15-459-80	Вогнебезпечна, нетоксична, час висихання н/б 10 с	Для нанесення маркування
3.9 Фільтрувальна тканина Петрянова ФПП-15-1,5	ТУ 2568-411- 05795731-2008	Волокна поліетилену хлорованого із середнім діаметром пор 1,5 мкм	Для очистки повітря
4. Напівпродукти			

Продовження таблиці 4.2

1	2	3	4
4.1 Посівний матеріал	За виробничим регламентом	Продуктивність культури- 2 г/л	
4.2 Культуральна рідина	За виробничим регламентом	Продуктивність культури- 3,2 г/л	

### 4.3 Опис технологічного процесу

#### ДР 1 Санітарна підготовка виробництва

##### ДР 1.1 Підготовка персоналу

##### ДР 1.1.1 Навчання персоналу та періодична перевірка знань

Власник зобов'язаний забезпечити навчання персоналу, в обов'язки яких входить робота у виробничих зонах та приміщеннях зберігання та лабораторіях, що відповідають за перевірку продукції (включаючи технічний і обслуговуючий персонал, співробітників, які здійснюють прибирання), а також іншого персоналу, діяльність якого може впливати на якість продукції згідно з СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2016. Окрім навчання щодо теорії та практики із системи управління якістю, всі співробітники повинні проходити навчання відповідно до закріплених за ним обов'язків. Співробітники, що працюють в зонах, де контамінація становить небезпеку, у чистих зонах або в зонах, де обробляють сильнодіючі, токсичні, інфікуючі або сенсibilізуючі речовини, повинні пройти спеціальне навчання [69].

Всі працівники підприємств перед початком роботи повинні проходити інструктаж з техніки безпеки. Працівники чистих приміщень повинні також бути ознайомлені з правилами поведінки у чистих приміщеннях. Обов'язковою процедурою є періодична перевірка набутих знань. Співробітників, які не пройшли навчання не можна допускати у зони виробництва і контролю якості [69].

##### ДР 1.1.2 Медичне обстеження персоналу

Відповідний санітарний стан персоналу забезпечується контролем стану здоров'я при прийомі на роботу, регулярним медичним оглядом, який

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						55
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		



проводиться не рідше одного разу на рік або за необхідністю, проведенням періодичної диспансеризації персоналу для виявлення хронічних захворювань, дотриманням правил особистої гігієни. Необхідною частиною підготовки персоналу є контроль його санітарно-гігієнічного стану. Для контролю санітарного стану персоналу потрібно проводити мікробіологічний контроль рук, шкіряного покриву та одягу.

Персонал допускається у виробничі приміщення тільки одягнутим в спеціальний одяг, який відповідає виконуваним обов'язкам працюючого. Технологічний одяг персоналу повинен відповідати класу чистоти тієї зони, у якій він працює, і виконувати своє основне призначення – максимально захищати продукт виробництва від частинок, що виділяються людиною. До технологічного одягу та персоналу персоналу, призначеного для зон різних типів, пред'являються наступні вимоги:

- Для класу D: волосся повинно бути закритим, потрібно носити захисний костюм загального призначення, та відповідне взуття або бахіли.

До працюючих в чистих зонах пред'являються високі вимоги по відношенню до особистої гігієни і чистоти. Перед тим як приступити до роботи спеціалісти повинні ретельно вимити руки теплою водою з милом і щіткою (протягом 1-2 хвилин). Основною метою такої механічної обробки рук – видалити поверхневу мікрофлору. Після миття руки обробляють різними дезінфікуючими засобами. В чистих приміщеннях не можна носити ручні годинники, ювелірні вироби, косметику [70].

## ДР 1.2 Підготовка дезінфікуючих та миючих розчинів

Миючі і дезінфікуючі засоби необхідно контролюють за мікробіологічною чистотою. Розчини слід тримати в попередньо очищених контейнерах (тарі) й зберігати лише протягом установлених термінів.

### ДР 1.2.1 Приготування розчину миючого засобу

В реактор із перемішуючим пристроєм через дозатор, подають 100,0 см<sup>3</sup> миючого засобу, який розводять питною водою до мітки 10 дм<sup>3</sup>. Після 10 хв перемішування отримуємо розчини для миття обладнання та комунікацій .

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						56
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

### ДР 1.2.2 Приготування розчину пероксиду водню

Розчин готують у реакторах змішувачах шляхом розведення 33%-го розчину пероксиду водню питною водою до утворення 6%-го пероксиду водню. Термін збереження робочого розчину 5 – 6 днів.

### ДР 1.2.3 Приготування розчину етилового спирту

Розчин готують у реакторах-змішувачах шляхом розведення 96% розчину етилового спирту питною водою до концентрації 76% [71].

## ДР 1.3 Підготовка виробничих приміщень

Підготовка виробничих приміщень включає комплекс заходів, що складаються з вологого прибирання та дезінфекції поверхонь приміщень і устаткування. Дезінфікуючі й антисептичні засоби необхідно чергувати кожні 1-3 міс з метою недопущення формування і поширення стійких форм мікроорганізмів.

### ДР 1.3.1 Щоденне прибирання

Прибирання проводять не рідше 1 разу на зміну. Приміщення за можливістю звільняють від устаткування, миють і дезінфікують стіни, двері, підлогу. Спочатку миють стіни і двері від стелі до підлоги. Потім миють і дезінфікують стаціонарне устаткування, і на остаток — підлогу; застосовують дезінфекційний розчин з розрахунку 200 мл на 1 м<sup>3</sup> площі. Після дезінфекції приміщення опромінюють ультрафіолетовим світлом. Обробку виробничих приміщень D класу чистоти проводять розчином пероксиду водню (масова частка — 3 %) з мийним засобом.

### ДР 1.3.2 Генеральне прибирання

Генеральне прибирання виробничих приміщень здійснюють використовуючи розчин пероксиду водню з мийним засобом. Стеля, стіни, двері та інші поверхні необхідно зрошувати з гідропульта робочим розчином в розрахунку 150-200 мл/м<sup>2</sup>. Після чого приміщення закривають на 30-40 хв, надлишок розчину видаляють за допомогою ганчірок і мочалок. Для підтвердження класу чистоти приміщень у робочому стані необхідно

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						57
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

періодично здійснювати мікробіологічний контроль і контроль вмісту механічних частинок у повітрі [71].

#### ДР 1.4 Підготовка обладнання та комунікацій

##### ДР 1.4.1 Мийка обладнання і комунікацій

Миття обладнання і комунікацій проводять наступним чином. Спочатку миють водою (холодною/гарячою), упродовж двох хвилин з передачею води у збірник нейтралізації, перед скидом рідини у систему каналізування рідких викидів. Миття продовжують розчином миючого та дезінфікуючого засобу, при 50-60°C, протягом 1 години з поверненням розчину в збірник нейтралізації.

##### ДР 1.4.2 Ополіскування обладнання та комунікацій

Проводиться ополіскування питною водою, з передачею води в збірник нейтралізації.

##### ДР 1.4.3 Перевірка герметичності обладнання та комунікацій

Перевірку на герметичність проводять подаючи пару, яка створює надлишковий тиск. Значення тиску контролюють по датчику, якщо тиск падає це означає що обладнання має дефекти. Ємкісне обладнання на герметичність перевіряють при повітряному тиску 0,5 – 0,6 МПа. Апарат з прилеглими трубопроводами перед загрузкою середовища перевіряють на герметичність під дією тиску (0,15–0,19) МПа. Всі вентилі перед установкою перевіряють гідравлічним пресуванням при тиску 0,3 МПа. Для герметизації фланців і вентилів використовують особливі прокладки з пароніту, обробленого графітом, для герметизації кришок апаратів застосовують шнур із прогумованої тканини діаметром до 19 мм, а для завантажувальних люків гуму товщиною 14 мм. Герметичність з'єднань перевіряють при надлишковому тиску пари 0,15- 0,2 МПа.

##### ДР 1.4.4 Стерилізація обладнання та комунікацій

Стерилізація обладнання та комунікацій проводиться термічним методом. При виробництві антибіотиків рекомендують стерилізувати обладнання та комунікації при 140°C, 2 год, при  $p=0,2$  мПа. Ефективність

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						58
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

термічної обробки обов'язково необхідно підтверджувати мікробіологічним контролем [72].

## ДР 2 Підготовка повітря

### ДР 2.1 Підготовка вентиляційного повітря

#### ДР 2.1.1 Забір повітря з атмосфери

Забір повітря з атмосфери здійснюють через спеціальні шахти заввишки 8-10 м (вологість 60-90%), які розташовують у найменш забруднених ділянках території підприємства.

#### ДР 2.1.2 Механічна очистка повітря

Атмосферне повітря проходить очистку на фільтрах першого ступеня, типу ФЯР — коміркові з вінілпластиковою сіткою. Ефективність очистки складає не менш ніж 60-90%. Основна функція фільтрів першої ступеню — видалення великих часток пилу для попередження абразивного пошкодження компресора. Ефективність очистки повинна складати 70% по часткам Корунда 4 мкм та 35% по атмосферному пилу для приміщень класу D. Фільтри працюють від початкового опору 50 Па до забивання 100 – 250 Па, після чого можуть регенеруватися, але не більше 5 разів. Повітря транспортується вентилятором/компресором. Підведення та відведення повітря відбувається по трубопроводам, на яких встановлені запірні вентиля з електроуправлінням та запобіжні клапани.

#### ДР 2.1.3 Стабілізація термодинамічних показників

Після попередньої очистки повітря поступає в кондиціонер. В кондиціонері відбувається усереднення та стабілізація фізико-хімічних показників повітря. Повітря з кондиціонера виходить під тиском 0,3 МПа,  $t=20^{\circ}\text{C}$ ,  $W=60\%$  [72, 73].

### ДР 2.2 Підготовка повітря для виробничого біосинтезу

#### ДР 2.2.1 Забір повітря з атмосфери

Забір повітря з атмосфери здійснюють через спеціальні шахти заввишки 8-10 м (вологість 60-90%), які розташовують у найменш забруднених ділянках території підприємства.

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						59
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

### ДР 2.2.2 Механічна очистка повітря

Атмосферне повітря проходить очистку на фільтрах першого ступеня, типу ФЯР — коміркові з вінілпластиковою сіткою. Ефективність очистки складає не менш ніж 60-90%. Основна функція фільтрів першої ступеню – видалення великих часток пилу для попередження абразивного пошкодження компресора. Ефективність очистки повинна складати 70% по часткам Корунда 4 мкм та 35% по атмосферному пилу для приміщень класу D. Фільтри працюють від початкового опору 50 Па до забивання 100 – 250 Па, після чого можуть регенеруватися, але не більше 5 разів. Повітря транспортується вентилятором/компресором. Підведення та відведення повітря відбувається по трубопроводам, на яких встановлені запірні вентиля з електроуправлінням та запобіжні клапани.

### ДР 2.2.3 Стабілізація термодинамічних показників

Після попередньої очистки повітря поступає в ресивер. В ресивері відбувається усереднення та стабілізація фізико-хімічних показників повітря. Повітря з ресивера виходить під тиском 0,3 МПа,  $t=20^{\circ}\text{C}$ ,  $W=60\%$ .

### ДР 2.2.4 Очистка повітря на головному фільтрі

Стерилізація повітря відбувається на фільтрі НЕРА, діаметр пор яких – 1,5 мкм. При експлуатації фільтрів необхідна їх стерилізація. Контроль та оцінка ефективності роботи повітряних фільтрів обов'язкові. Контроль якості очистки повітря включає визначення механічних часток та мікробної контамінації,  $E=98\%$ .

### ДР 2.2.5 Стерилізація повітря на індивідуальному фільтрі

Для індивідуальної очистки повітря використовують патронні фільтри із фільтрувальною тканиною Петрянова (ФПП-15-1,5 ). Матеріали типу ФПП забезпечують очищення повітря від тонкодисперсних аерозолів, при концентрації твердої фази до  $0,5 \text{ мг /м}^3$ . Матеріал ФПП являє собою шар ультратонких волокон із середнім розміром 1,5 мкм нанесених на марлеву підкладку. При збільшенні фільтруючого шару матеріалів ФПП, ступінь

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						60
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

очищення збільшується. Матеріали можуть уловлювати аерозолі з розмірами частинок до 0,1-0,2 мкм [72, 73].

### ДР 3 Підготовка поживного середовища

Поживне середовище, яке використовується для вирощування посівного матеріалу (ПМ) та виробничого біосинтезу продуцента *A.teichomyceticus* BNG 2315 – ТМ 1. До складу середовища входять:

- глюкоза – 10 г/л;
- соєвий шрот – 15 г/л;
- дріжджовий екстракт – 5г/л;
- солодовий екстракт – 30 г/л;
- $\text{CaCO}_3$  – 4 г/л.

#### ДР 3.1 Приготування композиції компонентів ПС та гомогенізація

Дозування сипких компонентів (соєвий шрот,  $\text{CaCO}_3$ ), рідких компонентів (дріжджовий екстракт, солодовий екстракт) та води відбувається за допомогою об'ємно-вагового дозатора. Всі компоненти дозуються в необхідній кількості, потім до потрібного об'єму доливається вода питна. Змішування компонентів поживного середовища здійснюється у реакторі із сорочкою та перемішуючим пристроєм (коефіцієнт заповнення – 0,75) при температурі 40-60 °С, протягом 60 хв.

#### ДР 3.2 Приготування та стерилізація розчину глюкози

Дозування глюкози здійснюється за допомогою дозатора. Концентрований розчин глюкози (50%) готується окремо в реакторі із сорочкою та перемішуючим пристроєм при температурі 40-60 °С, перемішування 200 об/хв, протягом 30 хв. Стерилізація розчину глюкози глухою парою проходить за умов: температура 110°C протягом 30 хв, надлишковий тиск  $p = 0,05$  МПа.

#### ДР 3.3 Стерилізація поживного середовища

Після гомогенізації ПС передається до ферментеру, де стерилізується гострою парою за наступних умов: тиск 0,1 МПа, температура пари 125°C,

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						61
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

протягом 30 хв. Після чого воно охолоджується до температури культивування [18, 74].

#### ДР 4 Підготовка посівного матеріалу

##### ДР 4.1 Відновлення музейної культури

Для відновлення музейної культури *A. teichomyceticus* BNG 2315 використовують агаризоване середовище соєво-манітовий агар (СМ). Музейну культуру стерильно пересівають на чашки Петрі з СМ. Чашки з інокулюмом інкубують у термостаті при 30 °С протягом 3 діб. Процес отримання ПМ проводять в асептичних умовах, здійснюючи мікробіологічний контроль.

##### ДР 4.2 Вирощування посівного матеріалу в колбах

Культуру стерильно переносять в колби з рідким середовищем ТМ 1 та інкубують при температурі 30 °С протягом 3 діб на качалці при 120 об/хв.

##### ДР 4.3 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі

В асептичних умовах культуру переносять із колб в посівний апарат об'ємом 1м<sup>3</sup> із поживним середовищем ТМ 1. Культуру інкубують протягом 4 діб, за температури 30 °С, рН 6,5-7. Оскільки культура *A. teichomyceticus* BNG 2315 аеробна необхідно забезпечити подачу та розподілення стерильного аераційного повітря. Подача кисню забезпечується барботером та становить 1м<sup>3</sup>/(м<sup>3</sup>хв). Процес культивування супроводжується перемішуванням – 200 об/хв [75, 76].

#### ТП 5 Виробничий біосинтез

Проведення процесу біосинтезу з точки зору його реалізації зводиться до забезпечення дозованої подачі потоків в ферментер, відводу від нього культуральної рідини (КР), тепла, відпрацьованого повітря, вимірювання фізико-хімічних параметрів середовища, а також управління міжфазним транспортом речовин в КР, тобто забезпечення оптимальних концентрацій субстратів/продуктів та гомогенності середовища в середині ферментера [76]. Подача поживних речовин та кисню до клітини та відведення продуктів метаболізму здійснюється між трьома фазами (тверда-БА, рідка-поживне

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						62
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

середовище, газоподібне-аеруюче повітря). Підведення кисню через його малу розчинність і відвід деяких розчинних газоподібних метаболітів забезпечується шляхом барботажу повітрям. Для інтенсифікації масообмінних процесів застосовують перемішування середовища. Енергію необхідну для підтримання життєдіяльності і росту мікроорганізмів отримують в результаті окислення субстрату [75].

Приготовлене стерильне ПС засівають посівним матеріалом, вирощеним в посівному апараті в кількості 10% від об'єму середовища. На ранній стадії виробничого біосинтезу швидкість потоку повітря становить від 1,0 до 1,5 об(об/хв), тиск у ферментері підтримується на рівні 0,2 до 0,3 бар, температура культивування становить від 30° С до 34 ° С, перемішування здійснюється зі швидкістю від 140 до 200 об/хв.

На середній стадії ферментації (48-90 годин від початку культивування) швидкість перемішування може поступово збільшуватися до діапазону швидкостей від 200 до 400 об/хв. Причиною цього є те, що поступове збільшення швидкості перемішування покращує споживання кисню культурою. Після того як швидкість перемішування поступово збільшується, швидкість потоку повітря може регулюватися від 0,4 до 0,8 об(об/хв). Культивування триває – 140 годин.

Через кожні 6 годин відбираються проби для визначення мікробіологічної чистоти, споживання джерел вуглецевого живлення та антибіотичної активності. Антибіотичну активність оцінюють методом ВЕРХ. Максимальна продуктивність культури досягається через 72-96 годин [18, 76]. Після завершення культивування культуральна рідина спускається через нижній штуцер та транспортується по трубопроводі до фільтра.

#### ТП 6 Відділення біомаси фільтруванням

Культуральна рідина отримана на стадії ТП 5 поступає на барабанний вакуум-фільтр. В якості фільтрувального матеріалу використовується бельтинг. Процес фільтрування відбувається протягом 40 хв, та робочого

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						63
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		



тиску – 0,05 атм. Отриманий фільтрат направляється на стадію виділення продукту, осад направляється до ЗВ 13 [78].

#### ТП 7 Виділення продукту абсорбційним методом

##### П 7.1 Приготування розчину елюенту

Розчин готують у реакторі-змішувачі шляхом розведення 99,95% розчину метанолу технічного водою до концентрації 40%.

##### ТП 7.2 Сорбція антибіотику на іонообмінній смолі

Фільтрат, отриманий на стадії ТП 6, подається на хроматографічну колонку заповнену смолою Diaion HP-2MG для сорбції тейкопланіну. Процес сорбції відбувається при температурі 12-18°C.

##### ТП 7.3 Елюювання антибіотика

Після завершення сорбції тейкопланіну абсорбційну смолу промивають водою, а тейкопланін елюють з абсорбційної смоли використанням елюючого агента – 40% розчину метанолу [36].

#### ТП 8 Очистка продукту ультрафільтрацією

Для відділення домішок (макромолекули, такі як ліпід, білок і полісахарид, пігменти), які елюються разом з молекулами антибіотика та концентрування розчину тейкопланіну застосовується ультрафільтраційна установка, де розчин обмиває волокна зовні, а фільтрат надходить у середину волокна. Робочим елементом ультрафільтраційних установок є напівпроникна мембрана із внутрішнім діаметром волокон 20-100 мкм і товщиною стінки 10-50 мкм, такі мембрани здатні відділяти речовини з молекулярною масою 3000 Да (молекулярна маса антибіотика становить 1900 Да, а молекулярна маса домішок від 5000 Да). Процес фільтрування відбувається за умов: рН від 3 до 8, при температурі 12°C до 18 °C, робочому тиску 0,6 МПа, продуктивність установки 700 л/год [78].

#### ТП 9 Концентрування розчину антибіотика

Розчин антибіотика отриманий на стадії ТП 8 концентрують у плівковому випарному апараті. Апарат працює при температурі 40-55 °C та тиску 0,03 мПа. Час перебування розчину в апараті становить 10-15 с.

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						64
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Продуктивність установки до 400 кг/год. Ступінь концентрування антибіотика 2 рази [79].

#### ТП 10 Сушіння продукту

Висушування препарату здійснюється сублімаційним методом. В процесі ліофілізації вода випаровується, минаючи рідкий стан. Досягається це в такий спосіб: на першому етапі, шляхом заморожування видаляється вільна вода, а зв'язана вода видаляється шляхом випарювання за допомогою вакуумної сушки.

##### ТП 10.1 Заморожування продукту

Процес заморожування являється важливим етапом ліофільної сушки, від якого залежить якість продукту. Чим швидше і глибше відбувається заморожування продукту, тим менше кристалів льоду встигає утворитися в речовині. Процес заморожування продукту відбувається поступово в камерах при температурі від 36°C до -60 °C за рахунок подачі холодоносія – фреону R22 в порожнину полиць, де знаходяться лотки із продуктом, під вакуумом 26,6 Па протягом 24 годин.

##### ТП 10.2 Висушування продукту

Після досягнення температури -60°C в конденсаторі ,холодильну камеру з'єднують з сушильною камерою, шляхом відкриття розділюючої засувки. Процес сушіння відбувається за наступних параметрів: тиск (50-70) Па; температура полиць 34-36 °C; температура продукту на полицях 34-36 °C .

Подача глізантину в полиці сушильної камери починається через три години від початку. Початкова температура глізантину дорівнює температурі навколишнього середовища. Протягом 20 – 25 годин глізантин циркулює через полиці сушильної камери. Після чого температуру глізантину підвищують на 2 – 4 °C /год до температури 34 – 36 °C. Коли температура продукту на полицях сушильної камери становитиме 34-36 °C процес висушування продовжують протягом 5-8 годин.

Після закінчення висушування заслонку зачиняють, відключають подачу фреону в конденсатор, відключають вакуум-насос, відключають насос,

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						65
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

що забезпечує циркуляцію глізантину, поступово подають стерильне повітря в камеру. Після того як в камері буде атмосферний тиск лотки з висушеним продуктом подають на стадію ПМВ 11 [75].

#### ПМВ 11 Фасування та пакування готового продукту

##### ПМВ 11.1 Фасування готового продукту в пакети

Фасування готового продукту відбувається безпосередньо після ліофільного висушування. Готовий порошок фасують за допомогою вагового дозатора у поліетиленові пакети масою 1 кг, пакети закриваються термозапаюванням.

##### ПМВ 11.2 Маркування готової продукції

Поліетиленові пакети із продуктом маркують шляхом нанесення етикетки на упаковку.

##### ПМВ 11.3 Пакування продукту в групову тару

Первинні упаковки складаються в групову тару – картонний ящик, по 5 штук, в кожен коробку. Коробки заклеюються липкою стрічкою, на коробку наноситься транспорте маркування [68].

#### ПВ 12 Переробка відходів

##### ПМ 12.1 Регенерація фільтрувальних матеріалів

Відновлення тканинних фільтрів відбувається за рахунок промивки їх гарячою водою (80 °С) та обробкою дезінфікуючими розчинами. Фільтрувальна тканина барабанного вакуум-фільтра регенерується шляхом продування стисненим повітрям [78].

##### ПМ 12.2 Відновлення іонообмінної смоли

Відновлення іонообмінної смоли відбувається за рахунок промивки її гарячою водою [36].

#### ЗВ 13 Знешкодження відходів та викидів

Контролювання викидів у атмосферу треба здійснювати згідно з РД 52.04.186-89 Настанова з контролю забруднення атмосфери та ЗУ «Про охорону атмосферного повітря». Стічні води треба очищати згідно з правилами, і вони повинні відповідати вимогам СанПіН 4630. Охорону ґрунту

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						66
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

від забруднення побутовими і промисловими відходами треба здійснювати відповідно до СанПіН 42-128-4690.

#### ЗВ 13.1 Знешкодження рідких відходів

Після санітарної обробки виробництва відпрацьовані миючі та дезінфікуючі розчини, промивні води після мийки обладнання збирають в збірнику нейтралізації, розводять водою у 3-4 рази, доводять рН середовища до 7,0 розчином хлоридної кислоти чи розчином лугу та зливають в каналізаційну систему. Некондиційний ПМ, та некондиційну КР, знешкоджують термічним способом, шляхом обробки гострою парою  $p = 0,3$  МПа при температурі 130-132°C протягом 45 хв, далі охолоджують подачею води в сорочку до 25-30°C, розбавляють водою, доводять рН середовища до 7,0 хлоридною кислотою або розчином лугу та зливають в каналізаційну систему.

#### ЗВ 13.2 Знешкодження твердих відходів

Тверді відходи виробництва у вигляді склобою, рукавичок, пакувальних матеріалів направляються для утилізації на міському сміттєзвалищі.

#### ЗВ 13.3 Знешкодження повітряних викидів

Відпрацьоване повітря від стадій ДР 4 та ТП 5 перед викидом в атмосферу очищують на фільтрах тонкої очистки. Для очистки повітря, що виходить від вентиляційних систем використовують фільтри з волокнистих матеріалів [72].

### 4.4 Матеріальний баланс

Матеріальний баланс виробництва антибіотика тейкопланіну розрахований на серію продукту обсягом 10 пакетів по 1 кг (табл. 4.3).

Виробничий біосинтез проходить у ферментері об'ємом 6,3 м<sup>3</sup> з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Об'єм культуральної рідини становить:  $V(KP) = 6300 \times 0,6 = 3780$  л.

Об'єм посівного матеріалу становить 10% від об'єму культуральної рідини:  $V(ПМ) = 3780 \times 0,1 = 378$  л.

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						67
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Об'єм поживного середовища становить:  $V(\text{ПС}) = 3780 - 378 = 3402$  л.

Враховуючи продуктивність культури 3,2 г/л, і об'єм культуральної рідини на стадії біосинтезу ми отримуємо:  $3,2 \text{ (г)} \times 3780 \text{ (л)} = 12096$  г тейкопланіну. Це кількість сухої чистої речовини препарату, що міг би бути отриманий теоретично, якщо б продукт не втрачався у різній кількості відповідно до використаних методів виділення для отримання кінцевої форми.

Таблиця 4.3 Матеріальний баланс виробництва антибіотика тейкопланіна

Використано				Отримано			
Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Назва кінцевого продукту або напівпродукту, відходів та втрат	Кількість		
	кг	шт	л		кг	шт	л
1	2	3	4	5	6	7	8
ТП 5							
Глюкоза	7			Культуральна рідина			3591
Соевий шрот	51			Втрати з виносом повітря 5 %			189
Дріжджовий екстракт	17						
Солодовий екстракт	102						
СаСО <sub>3</sub>	14						
Вода питна			3191				
ПМ			378				
Всього:	3780			Всього:	3780		
ТП 6							
Культуральна рідина			3591	Біомаса продуцента	453		
				Фільтрат			3030
				Втрати (3 %)			107
Всього:	3591			Всього:	3591		
ТП 7							
Фільтрат			3030	Елюат			769
Розчин метилового спирту 40 %			757	Рідкі відходи			2867
				Втрати (5%)			151

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5	6	7	8
Всього:	3787			Всього:	3787		
ТП 8							
Елюат			769	Домішки (10%)	1,55		
				Розчин антибіотика			729
				Втрати (5%)			38,45
Всього:	769			Всього:	769		
ТП 9							
Розчин антибіотика			729	Випарена вода			500
				Концентрований розчин антибіотика			228,48
				Втрати продукту (5 %)	0,52		
Всього:	729			Всього:	729		
ТП 10							
Розчин антибіотика 50 %	228,48			Сухий порошок тейкопланіна	10,1		
				Випарена вода			218,08
				Втрати продукту (3%)	0,3		
Всього:			228,48	Всього:			228,48
ПМВ 11							
Сухий порошок тейкопланіна	10,1			Розфасована та упакована продукція, в тому числі: субстанція антибіотика пакети етикетки коробки		10 10 10 2	
Поліетиленові пакети зі складу		10		Втрати при фасування (1%)	0,1		
Етикетки зі складу		10					
Коробки зі складу		2					
Всього:	32,1			Всього:	32,1		

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП 6211. 00.000 ПЗ

Арк.

69

## 4.5 Контроль виробництва

Контроль виробництва здійснюється з метою отримання якісного продукту, що відповідає наведеним вище вимогам. Контроль параметрів технологічного процесу здійснюють за допомогою вимірювальних пристроїв, що реєструють параметри технологічного процесу.

Виробничий штаб контролюють на виробництві за наступними показниками: морфологією; мікробіологічною чистотою; біохімічними властивостями; продуктивністю [74]. Перелік контрольних точок поданий в таблиці 4.4.

Таблиця 4.4 Перелік контрольних точок

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
1	2	3	4	5
ДР 1.1 Підготовка персоналу Км 1.1.1	Руки персоналу. Мікробна контамінація	Мікробіологічний метод	Змиви тампонами 2 рази в тиждень під час роботи роботи і 1 раз у два тижні після обробки дез. роз-ми	Після обробки не повинні містити м/о. У процесі роботи не більше 5 КУО у змивах рук одного працюючого
ДР 1.2.1 Приготування розчину миючого засобу Кт 1.2.1.1 Кх 1.2.1.2	Концентрація	Хімічний, аналітичний	Кожну операцію	30%
ДР 1.2.2 Приготування розчину пероксиду водню Кт 1.2.2.1 Кх 1.2.2.2	Концентрація	Хімічний, аналітичний	Кожну операцію	6%

Продовження таблиці 4.4

1	2	3	4	5
ДР1.2.3 Приготування розчину етилового спирту Кт 1.2.3.1 Кх 1.2.3.2	Концентрація	Хімічний, аналітичний	Кожну операцію	76%
ДР 1.3 Підготовка виробничих приміщень Км 1.3.1	Мікробіологіч на чистота поверхонь	Мікробіологіч ний метод	Кожну операцію	В 1 змиві з 1м <sup>2</sup> D-50 КУО
ДР 1.4 Підготовка обладнання та комунікацій Кт 1.4.1 Км 1.4.2	Мікробіологіч на чистота	Мікробіологіч ний метод	Змиви там- понами 2 рази в тиждень під час виробни- чого процесу; 1 раз у 2 тижні після обробки дез. роз-ми	В 1 змиві з 1м <sup>2</sup> D-50 КУО
2.1 Підготовка вентиляційного повітря Кт 2.1.1 Км 2.1.2	Температура	Автоматичний регулятор тем.	Кожну операцію	20°C
	Вологість	Психрометр	Кожну операцію	60%
2.2 Підготовка повітря для виробничого біосинтезу Кт 2.2.1 Км 2.2.2	Надлишковий тиск на вході у ферментер	Манометр	Постійно	0,03МПа
	Температура	Автоматичний регулятор тем.	Кожну операцію	32°C
	Вологість	Психрометр	Кожну операцію	60%
ДР 3.1 Приготування композиції компонентів ПС та гомогенізація Кт 3.1.1 Кх 3.1.2	Концентрація	Хімічний, аналітичний	Кожну операцію	Дріжджовий екстракт-5 г/л Соєвий шрот-15 г/л Солодовий екстракт-30 г/л СаСО <sub>3</sub> -4 г/л



Продовження таблиці 4.4

1	2	3	4	5
	Температура	Автоматичний регулятор температури	Кожну операцію	40-60 °С
	Час	Годинник	Кожну операцію	60 хв
ДР 3.2 Приготування та стерилізація розчину глюкози Кт 3.2.1 Кх.3.2.2 Км 3.2.3	Концентрація	Хімічний, аналітичний	Кожну операцію	50 %
	Температура	Автоматичний регулятор температури	Кожну операцію	110 °С
	Час	Годинник	Кожну операцію	30 хв
	Тиск	Манометр	Кожну операцію	0,05 МПа
ДР 3.3 Стерилізація поживного середовища Кт 3.3.1 Км 3.3.2	Температура	Автоматичний регулятор температури	Кожну операцію	125 °С
	Час	Годинник	Кожну операцію	30 хв
	Тиск	Манометр	Кожну операцію	0,1 МПа
ДР 4.1 Відновлення музейної культури Кт 4.1.1 Км 4.1.2	Режим інкубування: температура, час, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний метод	Кожну операцію	Температура 30 °С, тривалість 5 доби, відсутність сторонньої мікрофлори
ДР 4.2 Вирощування посівного матеріалу в колбах Кт 4.2.1 Км 4.2.2	Режим культивування : температура, час, мікробіологічна чистота перемішування	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний метод	Кожну операцію	Температура 30 °С, тривалість 3 доби, відсутність сторонньої мікрофлори, n= 120 об/хв
ДР 4.3 Вирощування посівного матеріалу	Режим культивування : температура, час,	Термопара, годинник, манометр,	Кожну операцію	Температура 30 °С, тривалість 4 доби, відсутність

Продовження таблиці 4.4

1	2	3	4	5
Кт 4.3.1 Км 4.3.2	Мікробіол-а чистота, Перем-ня аерація рН	мікробіологіч- ний метод, висів на чашки Петрі рН-метр	Кожну операцію	сторонньої мікрофлори, n=200 об/хв 1 м <sup>3</sup> /(м <sup>3</sup> хв) 6,5-7
ТП 5 Виробничий біосинтез Кт 5.1 Км 5.2	Температура, час, мікроб-на чистота, перем-ня аерація рН Концентрація антибіотика	Термопара, годинник, манометр, мікробіол-й метод, висів на чашки Петрі рН-метр ВЕРХ	Кожну операцію	Температура 30-34 °С, тривалість 140 годин, відсутність сторонньої мікрофлори, n=200-400 об/хв 1-1,5 м <sup>3</sup> /(м <sup>3</sup> хв) 6,5-7 3,2 г/л
ТП 6 Відділення біомаси фільтруванням Кт 6.1	Тиск	Вакуумметр	Кожну операцію	0,05 атм
	Час	Годинник	Кожну операцію	40 хв
ТП 7.1 Приготування розчину елюенту Кт 7.1.1 Кх 7.1.2	Концентрація	Хімічний, аналітичний	Кожну операцію	40%
ТП 7.2 Сорбція антибіотика на іонообмінній смолі Кт 7.2.1	Температура	Термометр	Кожну операцію	12-18 <sup>0</sup> С
ТП 8 Очистка продукту ультрафільтра- цією Кт 8.1	Тиск	Манометр	Кожну операцію	0,6 МПА
	Температура	Автоматичний регулятор температури	Кожну операцію	12-18 °С

Продовження таблиці 4.4

1	2	3	4	5
ТП 9 Концентрування розчину антибіотика Кт 9.1	Температура	Термопара	Кожну операцію	40-55 °С
	Тиск	Манометр	Кожну операцію	0,5 МПа
ТП 10 Сушка продукту Кт 10.1	Температура охолодження, тривалість охолодження, вакуум, тривалість сушки, вологість матеріалу	Регулятор температури автоматичний, годинник, вакуумметр, годинник	Кожну операцію	Температура -60 °С, тривалість охолодження 24 год, вакуум 26,6Па, час сушки 48 год, тиск 50-70 Па, вологість матеріалу не більше 1-3%
ПМВ 11 Фасування та пакування готового продукт Кт 11.1	Маса продукту	Ваговим методом	Кожну операцію	1кг

## РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

### 5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

Головним завданням при виборі апарату є забезпечення високої інтенсивності масо- й енергообміну клітин із середовищем. Масообмін визначається транспортом кисню та інших біогенних елементів із середовища в мікробну клітину із відведенням від неї продуктів обміну. Тому перемішування є одним з основних чинників, що забезпечують необхідний гідродинамічний стан в апараті [80]. Для культивування *A. teichomyceticus* BNG 2315 обраний ферментер з комбінованим підведенням енергії (рис. 5.1).

Корпус апарату складається із вертикальної циліндричної обичайки 1, кришки 7, на якій встановлений привід мішалки 5, та днища 8. Апарат працює під надлишковим тиском задля попередження контамінації культури. На еліптичних кришках розміщені патрубки 9 і 10 для підведення і відведення речовин, подачі стисненого газу, встановлення контрольно-вимірювальних приладів і т. д. Апарат обладнується сорочкою 2 для підведення і відведення теплоти. Електродвигун служить приводом перемішуючого пристрою, що сполучений із валом мішалки. Редуктори застосовують задля зменшення частоти обертання вала мішалки в порівнянні з валом електродвигуна.

Мішалка являється конструктивним елементом функція якої полягає у забезпеченні руху рідини в апараті. Для перемішування КР рідини була обрана відкрита турбінна мішалка [81]. До системи перемішування також належать відбивні перегородки, що являють собою вузькі металеві пластини, які прикріплені до внутрішніх стінок реактора. Перегородки переводять

					ДП 6211. 00.000 ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Михальчук В. В			РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	Літ.	Арк.
Консульт.		Фесенко С. В					Аркуші
						75	102
Керівник		Тодасійчук Т. С				КПІ ім. І.Горького ФБТ	
Затвер.							

круговий рух рідини у вихровий рівномірно розподіляючи рідину по всьому об'єму, тим самим перешкоджають утворенню виру навколо обертання мішалки [82].

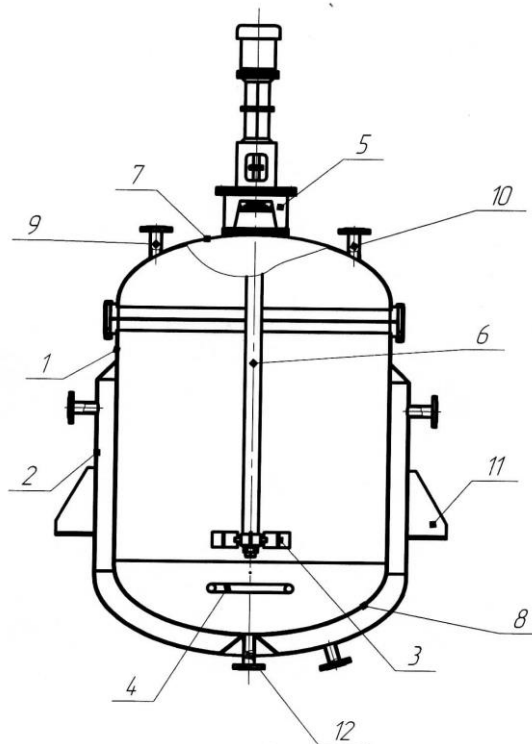


Рисунок 5.1 Ферментер з механічним перемішуючим пристроєм і барботером: 1 – корпус, 2 – сорочка; 3 – мішалка; 4 – барботер; 5 – двигун з приводом; 6 – вал мішалки; 7 – кришка; 8 – днище; 9,10 – штуцери; 11 – опора; 12 – штуцер для зливу продукту [81].

Функцією барботеру є подача газу або пари крізь шар рідини. Принцип роботи барботера полягає в підведенні бульбашок газу під шар рідини, які сприяють підйому вгору часток рідини, сприяючи інтенсивному перемішуванню рідини [83].

Для підтримки сталої температури апарат обладнаний сорочкою, в якості теплоносія використовується гаряча пара. Для забезпечення стерильності процесу апарат перед роботою стерилізують паром під тиском. Для максимального обмеження попадання в апарат конкуруючої мікрофлори та сторонніх речовин застосовуються різноманітні механізми ущільнення та спеціальні ущільнювальні матеріали. У якості ущільнення валу мішалки обрано подвійне торцеве ущільнення. Корпус реактора і внутрішні елементи

					ДП 6211. 00.000 ПЗ		Арк.
							76
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			

установки виконується з кислотостійкої сталі, оскільки рН у апараті є досить низьким [84]. Введення ПС, ПМ, розчинів кислот та лугів здійснюють через багатокорпусний вентель. Введення охолоджувальної води в сорочку ферментера здійснюють знизу, а вивіз зверху. Відпрацьовану воду спрямовують на установки зворотного осмосу. Пару, для нагріву КР під час ферментації подіють у верхній штуцер, а вивід пароконденсатної суміші здійснюють знизу. Відвід КР з ферментера здійснюють через нижній штуцер [85].

## 5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки

Вихідні дані для розрахунку:

- об'єм апарату –  $V=6,3 \text{ м}^3$ ;
- коефіцієнт заповнення –  $K_3=0,6$ ;
- температура в апараті підтримується на рівні  $t=32 \text{ }^\circ\text{C}$ ;
- процес аеробний.

### 5.2.1 Визначення теплофізичних властивостей середовища

Спочатку розраховуємо основні теплофізичні властивості ПС за температури –  $t_c = 32^\circ\text{C}$ .

Густина ПС:

$$\rho_c = 1007,3 + 4,11 \cdot (CB - 0,11 \cdot t_c); \quad (5.1)$$

$$\rho_c = 1007,3 + 4,11 \cdot (12 - 0,11 \cdot 32) = 1042,15 \text{ (кг/м}^3\text{)}.$$

Коефіцієнт динамічної в'язкості ПС:

$$\mu_c = (2,7 + 0,192 \cdot CB) \cdot t_c^{-m} \cdot 10^{-3}; \quad (5.2)$$

де  $CB = 7 \div 15$ ;  $m = 0,426$ .

$$\mu_c = (2,7 + 0,192 \cdot 12) \cdot 32^{-0,426} \cdot 10^{-3} = 1,07 \cdot 10^{-3} \text{ (Па} \cdot \text{с)}.$$

Коефіцієнт кінематичної в'язкості ПС:

$$\nu_c = \frac{\mu_c}{\rho_c}; \quad (5.3)$$

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						77
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$\nu_c = \frac{1,07 \cdot 10^{-3}}{1042,15} = 1,03 \cdot 10^{-6} \text{ (м}^2\text{/с)}.$$

Теплоємність ПС:

$$c_c = 4,073 - 0,00134 \cdot (14,4 \cdot \text{СВ} - t_c); \quad (5.4)$$

$$c_c = 4,073 - 0,00134 \cdot (14,4 \cdot 12 - 32) = 3,891 \text{ (кДж/кг} \cdot \text{К)}.$$

Коефіцієнт теплопровідності ПС:

$$\lambda_c = 0,5646 \cdot t_c^{0,0879} \cdot \text{СВ}^{-0,195} \quad (5.5)$$

$$\lambda_c = 0,5646 \cdot 32^{0,0879} \cdot 12^{-0,195} = 0,478 \text{ (Вт/м} \cdot \text{К)}. \text{ [84].}$$

### 5.2.2 Конструктивний розрахунок

Конструктивний розрахунок реактора включає визначення основних розмірів апарата та конструктивних елементів. Якщо відомий номінальний об'єм середовища та коефіцієнт заповнення  $K_3$ , робочий об'єм реактора розраховується за формулою:

$$V_p = V_n \cdot K_3; \quad (5.6)$$

$$V_p = 6300 \times 0,6 = 3780 \text{ л}$$

В таблиці 5.1 наведені основні технічні дані реактора з еліптичними кришками (ГОСТ 6533-78).

Таблиця 5.1 Основні технічні дані реактора з еліптичними кришками [86] .

Номінальний об'єм $\nu_n$ , м <sup>3</sup>	Діаметр апарата $D$ , мм	Площа поверхні теплообміну рубашки $F_p$ , м <sup>2</sup>	Площа поверхні теплообміну $F_3$ , м <sup>2</sup>		Діаметр вала мішалки $d_v$ , мм	Висота рівня рідини $H_j$ , м	
			1-й ряд	2-й ряд		$\varphi=0,75$	$\varphi=0,5$
6,3	1800	14,8	11,5	20,7	52	2,01	1,39

На основі цього, обрано апарат з еліптичним днищем і еліптичною знімною кришкою . За ГОСТ 20680–86 внутрішній діаметр апарату складає:

$$D_{вн} = 1800 \text{ мм} = 1,8 \text{ м}.$$

Висота корпусу  $H = 5780 \text{ мм} = 5,78 \text{ м}$ .

Далі слід розрахувати днище апарату. Висоту еліптичної частини днища ферментеру визначають за формулою:

$$h_{\text{ел.дн}} = 0,25 \cdot D_{\text{вн}}; \quad (5.7)$$

$$h_{\text{ел.дн}} = 0,25 \cdot 1800 = 450 \text{ (мм)} = 0,45 \text{ м}.$$

Оскільки еліптичні днища є стандартними виробами, то за ГОСТ 6533–78 можна обрати решту конструктивних розмірів днища апарату:

$$S_{\text{дн}} = 45 \text{ мм} = 0,045 \text{ м} - \text{товщина стінки еліптичного днища};$$

$$h_{\text{о.дн}} = 40 \text{ мм} = 0,04 \text{ м} - \text{висота основи еліптичного днища};$$

$$V_{\text{дн}} = 0,8887 \text{ м}^3 - \text{об'єм еліптичного днища}.$$

$$F_{\text{вн.дн}} = 3,74 \text{ м}^2 - \text{внутрішня поверхня еліптичного днища};$$

$$h_{\text{дн}} = h_{\text{ел.дн}} + h_{\text{о.дн}} = 0,45 + 0,04 = 0,49 \text{ (м)} - \text{повна висота днища}.$$

Тоді загальний об'єм ферментера становить:

$$V = V_{\text{ц}} + 2 \cdot V_{\text{дн}}; \quad (5.8)$$

Об'єм циліндричної частини:

$$V_{\text{ц}} = V - 2 \cdot V_{\text{дн}} = 6,3 - 2 \cdot 0,8887 = 4,52 \text{ (м}^3\text{)}.$$

Висота циліндричної частини апарату:

$$H_{\text{ц}} = \frac{V_{\text{ц}}}{F} = \frac{V_{\text{ц}} \cdot 4}{\pi \cdot D_{\text{вн}}^2} \quad (5.9)$$

$$H_{\text{ц}} = \frac{4,52 \cdot 4}{3,14 \cdot 1,8^2} = 1,78 \text{ (м)}.$$

Для перемішування обираємо турбінну мішалку і виконуємо розрахунок перемішуючого пристрою.

Діаметр мішалки становить:

$$\frac{D}{d_{\text{м}}} = 3 \div 4; \quad (5.10)$$

$$d_{\text{м}} = \frac{D}{4} = \frac{1,8}{4} = 0,45 \text{ м}.$$

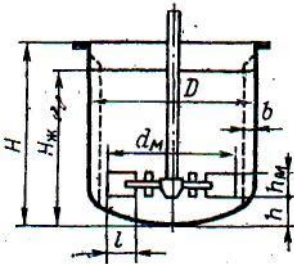
Зі стандартного ряду обираємо мішалку діаметром  $d_{\text{м}} = 450 \text{ мм} = 0,45 \text{ м}$ .

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						79
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		



При конструюванні повинні зберігатися основні співвідношення розмірів перемішуючих пристроїв таблиця 5.2.

Таблиця 5.2 Основні співвідношення розмірів перемішуючих пристроїв [87]

<p>Турбінна</p> 	$D/d_M=3\div 4;$ $h_M/d_M=0,2;$ $h/d_M=0,4\div 1;$ $l/d_M=0,25;$ $b/d_M=0,1;$ $\xi_M=8,4$
---	--

Розрахуємо геометричні розміри мішалки. Висота перемішуючого пристрою:

$$h_M = d_M \cdot 0,1 = 450 \cdot 0,1 = 45(\text{мм}) = 0,045 \text{ м.} \quad (5.11)$$

Висота розміщення перемішуючого пристрою над днищем апарату:

$$h = d_M \cdot 0,4 = 450 \cdot 0,4 = 180 \text{ мм} = 0,18 \text{ м.} \quad (5.12)$$

Товщина відбивної перегородки:

$$b = d_M \cdot 0,1 = 450 \cdot 0,1 = 45 (\text{мм}) = 0,045 \text{ м.} \quad (5.13)$$

Висоту рівня рідини в апараті обчислюється за формулою:

$$H_p = \frac{4(V_p - V_{дн})}{\pi D} + h_{дн}; \quad (5.14)$$

$$H_p = \frac{4(3,78 - 1,78)}{3,14 \cdot 1,8} + 0,49 = 1,9 \text{ м.}$$

[86].

### 5.2.3 Розрахунок глибини воронки

Для турбінної мішалки приймаємо оптимальну окружну швидкість перемішуючого пристрою:  $n = 3,3 \text{ с}^{-1}$ .

Параметр висоти завантаження  $\gamma$  апарата визначають за формулою:

$$\gamma = 8 \frac{H_p}{D} + 1; \quad (5.15)$$

$$\gamma = 8 \cdot \frac{1,9}{1,8} + 1 = 9,44 \text{ м.}$$

Параметр гідравлічного опору мішалки  $E$  знаходять за формулою:

$$E = \frac{\gamma}{\xi_M z_M Re_{\Pi}^{0,25}}; \quad (5.16)$$

$$E = \frac{9,44}{8,4 \cdot 1 \cdot (723,21 \cdot 10^3)^{0,25}} = 0,443.$$

За значенням параметру  $E$  знаходять параметр розподілення швидкості  $\psi_1$ .

$$\psi_1 = 1.$$

За значенням параметру  $\psi_1$  знаходять параметр глибини воронки  $B$ .

$$B = 6,5.$$

Глибина воронки:

$$h_B = \frac{B n^2 d_M^2}{2}; \quad (5.17)$$

$$h_B = \frac{6,5 \cdot 3,3^2 \cdot 0,45^2}{2} = 7,17(\text{м}).$$

Гранично допустима глибина воронки становить:

$$h_{\text{гр}} = H_p - h; \quad (5.18)$$

$$h_{\text{гр}} = 1,9 - 0,49 = 1,41 (\text{м}).$$

Перевіряємо, чи виконується співвідношення:

$$h_B > h_{\text{гр}}. \quad (5.19)$$

Оскільки  $7,17 > 1,41$ , в апараті портібно встановлювати перегородки [86].

#### 5.2.4 Розрахунок барботеру

Спочатку розрахуємо геометричні розміри барботеру. Висота перемішуючого пристрою над барботером становить:

$$h_{\delta} = 0,25 d_M \quad (5.20)$$

$$h_{\delta} = 0,25 \cdot 0,45 = 0,11 \text{ м.}$$

Діаметр барботеру:

$$D_0 = (0,5 - 0,75)$$

$$D_0 = 0,5 \cdot 0,45 = 0,23 \text{ м.}$$

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						81
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Діаметр отворів барботеру:

$$d_0 = 7 \text{ мм} = 0,007 \text{ м.}$$

Кількість отворів в барботері:

$$z_{\text{отв}} = \frac{4V_{\Gamma}}{\pi d_0^2 W_0}, \quad (5.20)$$

де  $V_{\Gamma} = 0,27 \text{ м}^3/\text{с}$ .  $W_0 = 20 \text{ м/с}$ , тоді:

$$z_{\text{отв}} = \frac{4 \cdot 0,27}{3,14 \cdot 0,007^2 \cdot 20} = 350 \text{ (отворів)}.$$

Кількість отворів в одному ряду становить:

$$z_{\text{отв}_1} = \frac{\pi D_0}{t_{\text{отв}}}. \quad (5.21)$$

Відстань між отворами становить  $t_{\text{отв}} = 0,01 \text{ м}$ .

Тоді:

$$z_{\text{отв}_1} = \frac{3,14 \cdot 0,23}{0,01} = 72 \text{ (отворів)}.$$

Сумарна площа поперечного перерізу отворів барботера:

$$S_{\text{отв}} = \frac{\pi}{4} d_0^2 \cdot z_{\text{отв}}; \quad (5.22)$$

$$S_{\text{отв}} = \frac{3,14}{4} \cdot 0,007^2 \cdot 350 = 0,013 \text{ (м}^2\text{)}. [87].$$

### 5.2.5 Розрахунок потужності, що витрачається на перемішування

Потужність, що витрачається на перемішування визначають за формулою:

$$N_{\text{м}} = K_N \cdot \rho_{\text{с}} \cdot n^3 \cdot d_{\text{м}}^5; \quad (5.23)$$

$$Re_{\text{ц}} = \frac{\rho_{\text{с}} \cdot n \cdot d_{\text{м}}^2}{\mu_{\text{с}}}; \quad (5.24)$$

$$Re_{\text{ц}} = \frac{1042,15 \cdot 3,3 \cdot 0,45^2}{1,07 \cdot 10^{-3}} = 65,09 \cdot 10^5.$$

За графіком нормалі знаходимо значення  $K_N = f(Re_{\text{ц}})$ :

$$K_N = 0,8.$$

Тоді за потужність, що споживається, становить:

$$N_{\text{м}} = 0,8 \cdot 1042,15 \cdot 3,3^3 \cdot 0,45^5 = 552,87 \text{ (Вт)}$$

Розрахункова потужність на валу мішалки:

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						82
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$N_p = K_n \cdot K_H \cdot (\sum K_i + 1) \cdot N_m; \quad (5.25)$$

де  $K_n$  – коефіцієнт, що враховує збільшення потужності, що споживається, при пуску чи в результаті збільшення опору середовища при перемішуванні, приймаємо  $K_n = 1$ .

Коефіцієнт, що враховує ступінь заповнення апарату середовищем:

$$K_H = \frac{H_p}{D_{BH}}; \quad (5.26)$$

Сума коефіцієнтів, що враховують збільшення потужності через наявність в апараті допоміжних пристроїв та барботера:  $\sum K_i = 4,4$

Тоді:

$$N_p = 1,06 \cdot 1 \cdot (4,4 + 1) \cdot 552,87 = 3164,63(\text{Вт}).$$

Потужність, що витрачається на тертя в одинарному торцевому ущільненні визначається за формулою:

$$N_{уш} = 6020 \cdot d_B^{1,3}; \quad (5.27)$$

де діаметр валу  $d_B = 52 \text{ мм} = 0,052 \text{ м}$ .

$$N_{уш} = 6020 \cdot 0,052^{1,3} = 128,94 (\text{Вт}).$$

Кінцева встановлена потужність приводного електродвигуна для перемішуючого пристрою ферментера:

$$N_{уст} = 1,15 \cdot \frac{N_p + N_{уш}}{\eta}; \quad (5.28)$$

де  $\eta = 0,9$  – ККД редуктора приводу.

Тобто:

$$N_{уст} = 1,15 \cdot \frac{3164,63 + 128,94}{0,9} = 4208,45(\text{Вт}). [82].$$

### 5.2.6 Тепловий розрахунок

Надходження енергії у посівний апарат відбувається:

1) із ПС:

$$E_{пс} = M_c \cdot C_c \cdot t_c = \rho_c \cdot V_p \cdot 0,9 \cdot C_c \cdot t_c; \quad (5.29)$$

$$E_{пс} = 1042,15 \cdot 3,78 \cdot 0,9 \cdot 3891 \cdot 32 = 441,44(\text{МДж}).$$

2) із ПМ:

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						83
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$E_{\text{пм}} = M_{\text{пм}} \cdot C_{\text{пм}} \cdot t_{\text{пм}} = \rho_{\text{пм}} \cdot 0,1 \cdot V_{\text{р}} \cdot C_{\text{пм}} \cdot t_{\text{пм}}; \quad (5.30)$$

$C_{\text{пм}} = 3927 \text{ Дж/кг} \cdot \text{К}$  – питома теплоємність ПМ,

$t_{\text{пм}} = 32^\circ\text{C}$  – температура ПМ,

$\rho_{\text{пм}} = 1050 \text{ кг/м}^3$  – густина ПМ,

$$E_{\text{пм}} = 1050 \cdot 0,1 \cdot 3,78 \cdot 3927 \cdot 32 = 49,87 \text{ (МДж)}.$$

3) з повітрям:

$$E_{\text{пов}_1} = M_{\text{пов}} \cdot C_{\text{пов}} \cdot t_{\text{пов}} = \rho_{\text{пов}} \cdot V_{\text{г}} \cdot \tau_{\text{пр}} \cdot C_{\text{пов}} \cdot t_{\text{пов}}; \quad (5.31)$$

$\rho_{\text{пов}} = 1,22 \text{ кг/м}^3$  – густина повітря при температурі  $32^\circ\text{C}$ ,

$C_{\text{пов}} = 1005 \text{ Дж/кг} \cdot \text{К}$  – питома теплоємність повітря,

$t_{\text{пов}} = 32^\circ\text{C}$  – початкова температура повітря,

$\tau_{\text{пр}} = 140 \text{ год} = 504000 \text{ с}$  – тривалість процесу культивування,

$V_{\text{г}} = 0,025 \text{ м}^3/\text{с}$  – витрати повітря,

$$E_{\text{пов}_1} = 1,22 \cdot 0,025 \cdot 504000 \cdot 1005 \cdot 32 = 494,36 \text{ (МДж)}.$$

4) теплота, що виділяється в результаті дисипації механічної енергії від перемішуючих пристроїв:

$$E_{\text{дис}_1} = N_{\text{м}} \cdot \tau_{\text{пр}}; \quad (5.32)$$

$$E_{\text{дис}_1} = 539,31 \cdot 504000 = 271,81 \text{ (МДж)}.$$

5) теплота від реакції, що протікає у ферментері:

$$E_{\text{р}} = m_{\text{цук}} \cdot r_{\text{цук}}; \quad (5.33)$$

$$m_{\text{цук}} = 0,022 \cdot 0,9 \cdot V_{\text{р}} \cdot \rho_{\text{с}}; \quad (5.34)$$

$$m_{\text{цук}} = 0,022 \cdot 0,9 \cdot 3,78 \cdot 1042,15 = 77,9 \text{ (кг)};$$

$$E_{\text{р}} = 77,9 \cdot 0,9 = 70,2 \text{ (МДж)}.$$

Сумарна кількість надходжень теплоти до ферментеру:

$$\sum E_{\text{надх}} = E_{\text{пс}} + E_{\text{пм}} + E_{\text{пов}} + E_{\text{дис}_1} + E_{\text{р}}; \quad (5.35)$$

$$\sum E_{\text{надх}} = 441,44 + 49,87 + 494,36 + 271,81 + 70,2 = 1327,68 \text{ (МДж)}.$$

Витрати теплової енергії здійснюються:

1) з КР:

$$E_{\text{к}} = M_{\text{к}} \cdot C_{\text{к}} \cdot t_{\text{к}} = \rho_{\text{к}} \cdot V_{\text{р}} \cdot C_{\text{к}} \cdot t_{\text{к}}; \quad (5.36)$$

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						84
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

де  $C_K = 4070 \text{ Дж/кг} \cdot \text{К}$  – питома теплоємність КР,

$t_K = 32^\circ\text{C}$  – температура КР,

$\rho_K = 1050 \text{ кг/м}^3$  – густина КР,

$$E_K = 1050 \cdot 3,78 \cdot 4070 \cdot 32 = 516,92 \text{ (МДж)}.$$

2) з повітрям:

$$E_{\text{пов}_2} = M_{\text{пов}} \cdot C_{\text{пов}} \cdot t_c = \rho_{\text{пов}} \cdot V_{\text{Г}} \cdot \tau_{\text{пр}} \cdot C_{\text{пов}} \cdot t_c; \quad (5.37)$$

$$E_{\text{пов}_2} = 1,22 \cdot 0,025 \cdot 504000 \cdot 1005 \cdot 30 = 463,47 \text{ (МДж)}.$$

3) втрати теплоти в навколишнє середовище при нагріванні:

$$E_{\text{втр}} = 0,02 \cdot (E_K + E_{\text{пов}_2}); \quad (5.38)$$

$$E_{\text{втр}} = 0,02 \cdot (516,92 + 463,47) = 0,19 \text{ (МДж)}.$$

Сумарні витрати становлять:

$$\sum E_{\text{витрат}} = E_K + E_{\text{пов}_2} + E_{\text{втр}}; \quad (5.39)$$

$$\sum E_{\text{витрат}} = 516,92 + 463,47 + 0,19 = 1160,58 \text{ (МДж)}.$$

Теплове навантаження у ферментері становить:

$$E_T = \sum E_{\text{витрат}} - \sum E_{\text{надх}}; \quad (5.40)$$

$$E_T = 1327,68 - 1160,58 = 167,1 \text{ (МДж)}.$$

$$Q = M_T \cdot C_T \cdot (t_{\text{ТП}} - t_{\text{ТК}}). \quad (5.41)$$

$$M_T = \frac{Q}{C_T \cdot \Delta t_T}; \quad (5.42)$$

де  $C_T = 4200 \text{ Дж/кг} \cdot \text{К}$  – питома теплоємність теплоносія,

$\Delta t_T = 10^\circ\text{C}$  – різниця між початковою та кінцевою температурами теплоносія,

$$M_T = \frac{167,1 \cdot 10^6}{4200 \cdot 10} = 3,97 \cdot 10^3 \text{ (кг)}.$$

Масові витрати теплоносія:

$$G_T = \frac{M_T}{\tau_{\text{пр}}}; \quad (5.43)$$

$$G_T = \frac{3,97 \cdot 10^3}{504000} = 0,008 \text{ (кг/с)}.$$

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						85
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Визначаємо початкову та кінцеву температури теплоносія. Оскільки у ферментері відбувається процес охолодження, то:

$$t_p + \Delta t_{cp} = t_T. \quad (5.44)$$

Приймаємо  $\Delta t_{cp} = 10^\circ\text{C}$ .

Тоді [86]:

$$t_T = 30 - 10 = 20^\circ\text{C};$$

$$t_{\text{ТП}} = 18^\circ\text{C};$$

$$t_{\text{ТК}} = 23^\circ\text{C}.$$

Для того щоб визначити поверхню теплообміну необхідно розрахувати коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія у сорочці та від середовища у ферментері та коефіцієнт теплопередачі.

Щоб розрахувати коефіцієнт тепловіддачі від середовища до стінки визначаємо:

Критерій Нуссельта:

$$Nu_c = 1,35 Re_c^{0,59} \cdot Pr_c^{0,38} \left( \frac{\mu_c}{\mu_{\text{ст}}} \right)^{0,14} \quad (5.45)$$

Критерій Рейнольдса:

$$Re_c = \frac{d_m}{\nu_c} (n d_m + 4 W_r); \quad (5.46)$$

$$W_r = \frac{4 V_r}{\pi D^2}; \quad (5.47)$$

$$W_r = \frac{4 \cdot 0,27}{3,14 \cdot 1,8^2} = 0,1 \text{ (м/с)}$$

Тоді:

$$Re_c = \frac{0,45}{1,03 \cdot 10^{-6}} (3,3 \cdot 0,45 + 4 \cdot 0,1) = 0,64 \cdot 10^6$$

Критерій Прандтля:

$$Pr_c = \frac{\mu_c \cdot c_c}{\lambda_c}; \quad (5.48)$$

$$Pr_c = \frac{1,07 \cdot 10^{-3} \cdot 3891}{0,478} = 8,7$$

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						86
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$Nu_c = 1,35 \cdot (0,64 \cdot 10^6)^{0,59} \cdot 8,7^{0,38} = 8184,6$$

Коефіцієнт тепловіддачі від КР у ферментері становить:

$$\alpha_c = \frac{8184,6 \cdot 0,478}{1,8} = 2173,47 (\text{Вт/м}^2 \cdot \text{К}) \quad (5.49)$$

Коефіцієнт тепловіддачі від стінки апарату до води:

$$\alpha_2 = \frac{Nu_2 \cdot \lambda}{H_p} \quad (5.50)$$

$$\text{де } Nu_2 = C \cdot (Gr \cdot Pr)^a \quad (5.51)$$

$$Gr \cdot Pr = H_{\text{руб.}}^3 (t_{\text{ст}} - \theta_{\text{ср}}) \cdot B = 1,9^3 (25 - 20) \cdot 24,125 \cdot 10^9 = 827,37 \cdot 10^9,$$

Висоту сорочки приймаємо рівній висоті рівня рідини. Оскільки добуток  $Gr \cdot Pr > 10^9$ , то коефіцієнти у формулі для визначення критерія Нуссельта мають такі значення:  $C = 0,15$ ,  $a = 0,33$ , а отже:

$$Nu_T = 0,15 \cdot (827,37 \cdot 10^9)^{0,33} = 1285,09$$

$$\alpha_T = \frac{1285,09 \cdot 0,609}{1,9} = 411,9 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}.$$

Коефіцієнт теплопередачі становить:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_c} + \frac{\delta_{\text{ст}}}{\lambda_{\text{ст}}} + \frac{1}{\alpha_T}}; \quad (5.52)$$

де  $\lambda_{\text{ст}} = 16 \text{ Вт/м} \cdot \text{К}$  – теплопровідність стінки,

$$K = \frac{1}{\frac{1}{2173,47} + \frac{0,01}{16} + \frac{1}{411,9}} = 284,9 (\text{Вт/м}^2 \cdot \text{К}).$$

Розрахункова поверхня теплообміну:

$$F_p = \frac{Q}{K \cdot \Delta t_{\text{ср}} \cdot \tau_{\text{пр}}}; \quad (5.53)$$

$$F_p = \frac{167,71 \cdot 10^6}{284,9 \cdot 10 \cdot 9000} = 6,54 (\text{м}^2).$$

Дійсна поверхня теплообміну:

$$F_d = \pi D H_c; \quad (5.54)$$

$$H_c = H_p - h_{\text{дн}}; \quad (5.55)$$

$$H_c = 1,9 - 0,49 = 1,41 (\text{м}).$$

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						87
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		



$$F_d = 3,14 \cdot 1,8 \cdot 1,41 = 7,96(\text{м}^2).$$

Умова теплообміну виконується, оскільки:

$$F_p < F_d. \quad (5.56)$$

[89].

### 5.3. Вибір загальнозаводського обладнання

Важливим обладнанням для транспортування рідин на підприємстві є насоси. Насоси використовують для переміщення рідин у трубопроводах і апаратах. Переміщення пов'язане з подоланням сил тертя, місцевих опорів, а також витратами енергії на підйом рідини з нижчого на вищий рівень.

Насоси поділяють на два класи відповідно до робочої камери та сполучення її зі входом і виходом насоса: об'ємні та динамічні. Переміщення рідини в об'ємних насосах відбувається шляхом зміни об'єму камери, яка поперемінно з'єднується з входом і виходом насоса. До об'ємних насосів належать поршневі, мембранні, ротаційні та ін.

Переміщення рідини у динамічних насосах відбувається під дією сили на неї в камері, яка сполучається з виходом і входом насоса. До них належать такі основні типи: відцентрові, осьові (пропелерні), роторні, гвинтові, вихрові, струминні [90].

Для транспортування культуральної рідини був обраний відцентровий насос CSF серія CR. Деталі, що стикаються з середовищем – нерж. сталь CF-3М 1.4404. Насос обладнаний торцевими ущільненнями: одинарне внутрішньо торцеве ущільнення, одинарне зовнішнє торцеве ущільнення, подвійне торцеве ущільнення з проливкой [91].

Відцентрові насоси мають ряд переваг: висока продуктивність, невеликі розміри, можливість безпосереднього приєднання до електродвигуна, прості за конструкцією, що дозволяє виготовляти їх із різноманітних матеріалів [91].

#### 5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

Основною умовою забезпечення безпеки роботи є суворе дотримання технологічного регламенту проведення всіх операцій. Обладнання повинно бути розміщено в просторах приміщеннях, світлих, теплих, з проходами та проїздами до 2 м шириною з облицювальними плитками на стінах, гладкою водонепроникною підлогою.

У мікробіологічній промисловості присутня значна кількість виробничих процесів, які відбуваються при високих температурних режимах стерилізації обладнання, трубопроводів та поживний середовищ, що знаходяться в апаратах при підвищеному тиску. Для запобігання електричних іскор та осередків високої температури поверхні нагрівання установки повинні бути в герметичному виконанні. Усі апарати та трубопроводи для зменшення виділення тепла покривають теплоізоляцією з температурою на поверхні не більше 45 °С. Інструкції з техніки безпеки повинні бути на всіх видах обладнання. Трубопроводи повинні бути пофарбовані в кольори відповідно до середовища, яке вони транспортують [92].

Конструкція апаратів повинна відповідати вимогам ГОСТ 12.2.003-74, ГОСТ 25167-82 і "Правил будови і безпечної експлуатації посудин, що працюють під тиском". Залежно від призначення і умов експлуатації в конструкції апарату повинні бути передбачені заходи щодо запобіжників можливості впливу на персонал наступних небезпечних і шкідливих виробничих факторів:

- руйнування обладнання від перевищення внутрішнього тиску середовища;
- роботи персоналу з рухомими частинами;
- підвищеної загазованості і температури повітря робочої зони;
- підвищеного рівня статичної електрики;
- підвищеного шуму і вібрації на робочому місці.

Корпуси апаратів і їх окремі елементи повинні відповідати вимогам ОСТ 26-291-79. Апарати, що працюють під надлишковим тиском, повинні бути захищені від неприпустимого перевищення тиску запобіжними пристроями. Апарати повинні бути герметичні по відношенню до зовнішнього середовища. Апарат необхідно забезпечити штуцерами для відведення і підведення продуктів, теплоносія, для промивання, продування, для установки запобіжних пристроїв, контрольно-вимірювальних приладів і арматури. Опори, що застосовуються для апаратів, повинні відповідати вимогам ОСТ 26-665-79 [93].

Скид промислових стічних вод у міську каналізаційну систему проходить у відповідності до «Санітарних норм проектування» СНіП. Перед скидом у каналізаційну систему промислові води повинні проходити первинну очистку для вилучення та регенерації цінних продуктів, та зниження концентрації мінеральних та органічних солей. Також проводиться вилучення вибухонебезпечних та пожежонебезпечних газів, масел, смол, токсичних речовин.

Промислові стічні води перед скидом в каналізаційну систему піддаються первинному очищенню з метою нейтралізації лугів, кислот, вилучення масел та смол. Основними показниками, що характеризують забруднення вод є:

1.хімічне поглинання кисню – показник вмісту органічних речовин у воді, виражається в міліграмах кисню (або іншого окислювача в перерахунку на кисень), який пішов на окислення органічних речовин, що містяться в літрі (1 дм<sup>3</sup>) води

2. біологічне поглинання кисню – кількість кисню, витрачена на аеробне біохімічне окислення під дією мікроорганізмів і розкладання нестійких органічних сполук, що містяться в досліджуваній воді.

Механічне очищення застосовується для виділення нерозчинних домішок мінерального і органічного походження на решітках, пісковловлювачах, ситах, у відстійниках, гідроциклонах і фільтрах, шляхом

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						90
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

фільтрації через шари зернистого матеріалу (пісок, антрацит, керамзит, горілі породи, полістирол і т.д.) для більш повного очищення стічних вод. Фільтри затримують до 90-95% суспензії і знижують близько 20% забруднень по БПК<sub>20</sub>.

Хімічне очищення застосовується для видалення розчинених домішок, тобто в разі, коли виділення їх із стічних вод можливо тільки в результаті хімічних реакцій між забрудненням і реагентом. При цьому забруднення окислюються або відновлюються і переходять на нетоксичні і малотоксичні продукти або в нерозчинні сполуки. [94].

Оскільки на біотехнологічних підприємствах використовуються великі об'єми повітря, особливу увагу приділяють очищенню відпрацьованого повітря перед викидом його в атмосферу. Процес очистки повітря проходить на масляних фільтрах ФТО-1000 чи ФТО-750. Відпрацьоване запилене повітря очищається на масляних фільтрах, циклонах чи рукавних фільтрах [95].

					ДП 6211. 00.000 ПЗ	Арк.
						91
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

## ВИСНОВКИ

1. У проекті виробництва антибіотику тейкопланіна обрано продуцента *Actinoplanes teichomyceticus* BNG 2315 із біосинтетичною активністю 3,2 г/л культуральної рідини.

2. У роботі розглянуті основні методи селекції промислових продуцентів та наведено схему отримання продуценту шляхом обробки вихідної культури ультрафіолетовим випромінюванням (30 Вт, 120с).

3. Виходячи із фізіолого-біохімічних особливостей продуценту *Actinoplanes teichomyceticus* BNG 2315 обрано оптимальний склад поживного середовища ТМ 1 – глюкоза, соєвий шрот, солодовий та дріжджовий екстракти, кальцій карбонат. Визначені основні параметри культивування продуцента: температура 32 °С, перемішування 200-400 об/хв, тривалість 140 год, аерація 1 об(об/хв).

4. На основі фізіолого-біохімічних характеристик продуцента було обрано ферментер із механічним перемішуючим пристроєм (турбінна мішалка швидкість обертання 3,3 с<sup>-1</sup>) та барботером (швидкість подачі повітря 1 об(об/хв)), які забезпечують надходження кисню до культури та ефективний масообмін в ході виробничого біосинтезу.

5. Для виділення та очистки продукту було запропоновано абсорбційний спосіб із використанням іонообмінної смоли Diaion HP-2MG, з подальшою ультрафільтрацією розчину для відділення домішок. Висушування продукту відбувається ліофільно з метою уникнення руйнування та втрати активності антибіотика.

6. Розроблено технологічну та апаратурну схему виробництва антибіотику тейкопланіна у відповідності до вимог до готової форми та якості продукту. Продукт фасується в поліетиленові пакети масою 1 кг.

					ДП 6211. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Михальчук В. В			ВИСНОВКИ	Стадія	Арк.	Аркушів
Перевір.							92	102
Керівник		Тодосіючук Т. С				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Затвер.								